



Rôles du chimiotactisme et de la mobilité flagellaire dans la fitness des *Xanthomonas*

Arnaud Indiana

► To cite this version:

Arnaud Indiana. Rôles du chimiotactisme et de la mobilité flagellaire dans la fitness des *Xanthomonas*.
Biologie végétale. Université d'Angers, 2014. Français. NNT : 2014ANGE0009 . tel-01251562

HAL Id: tel-01251562

<https://theses.hal.science/tel-01251562>

Submitted on 6 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat

Arnaud INDIANA

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : VENAM (Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer)

Discipline : 3DOSa

Spécialité : Sciences Agronomiques

Unité de recherche : INRA UMR1345 IRHS

Soutenue le 15/12/2014

Thèse N° : 1445

Rôles du chimiotactisme et de la mobilité flagellaire dans la fitness des *Xanthomonas*

JURY

Rapporteurs :

Marie-Anne BARNY, Directeur de recherche, IEES
Matthieu ARLAT, Professeur, LIPM

Examineurs :

Monique ZAGOREC, Directeur de recherche, ONIRIS SECALIM
Alain SARNIGUET, Directeur de recherche, INRA IGEPP
Philippe SIMONEAU, Professeur, Université d'Angers

Directeur de Thèse :

Marie-Agnès JACQUES, Directeur de recherche, INRA IRHS

Remerciements

Une des parties les plus importantes d'un manuscrit de thèse, sinon la plus importante, est, pour moi, celle qui concerne les remerciements. C'est effectivement l'occasion d'adresser aux gens ma reconnaissance. Je remercie donc avec plaisir toutes les personnes qui ont participé, à leur manière, à ce projet de thèse.

Pour commencer, merci à la région Pays de la Loire et l'INRA pour avoir financé cette thèse.

Je remercie les deux rapporteurs de ma thèse, Marie-Anne Barny et Matthieu Arlat, et les examinateurs, Monique Zagorec, Alain Sarniguet et Philippe Simoneau. Merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie aussi les membres de mon comité de suivi de thèse, Emmanuelle Lauber et Ralf Koebnik pour nos discussions scientifiques fructueuses et pour vos propositions de nouvelles idées à tester.

Je remercie toute l'équipe EmerSys pour leur accueil et les partages de tous les jours : Marie-Agnès Jacques, Armelle Darrasse, Martial Briand, Déborah Merda, Perrine Portier, Marion Le-Saux, Matthieu Barret, Tristan Boureau, Nicolas Chen, Samir Rezki, Mylène Ruh, Sophie Bonneau, Karine Durand, Christelle Brin, Anne Préveaux, Géraldine Taghouti, Cécile Dutrieux, Jacky Guillaumes, Céline Rousseau, Audrey Lathus, Jean-François Guimbaud, Amandine Cunty et Sophie Cesbron. Je remercie aussi tous ceux avec qui j'ai interagi dans le bâtiment C et le bâtiment B.

Je tiens à remercier particulièrement ma directrice de thèse, Marie-Agnès Jacques qui m'encadre depuis mon Master 2. Merci pour ta disponibilité lors de ces trois années de thèse, merci pour ton soutien lors des périodes difficiles, merci pour la formatrice enrichissante que tu es, tant au niveau personnel que scientifique, merci beaucoup pour ta grande aide tout au long de cette thèse et tes corrections lors de l'écriture de ce manuscrit. Je te remercie également de m'avoir donné la possibilité, non seulement d'assister mais aussi de participer à

un congrès international *via* une communication orale, à Shanghai en Chine, ICPPB2014. De la même façon, ce séjour a été enthousiasmant aussi bien culturellement que scientifiquement. J'en profite pour remercier Boris Vinatzer, David Guttman, Carolee Bull, James Alfano, Caitilyn Allen, Ian Toth et Steven Lindow pour nos conversations enrichissantes lors de ce séjour.

Un grand merci à ma co-encadrante, Armelle Darrasse, c'était un plaisir de partager ton bureau pendant trois ans. Je te remercie de ta disponibilité et ta rigueur scientifique. J'ai bien aimé nos discussions partagées, tes idées toujours riches et variées lors des réunions hebdomadaires et tes corrections de ce manuscrit. Vive les pseudogènes !!! Bises à Ella !

Tristan Boureau, je t'adresse un grand merci pour m'avoir accompagné depuis la licence, pendant le master et jusqu'à la thèse. Je te remercie encore de m'avoir fait confiance et d'avoir tout fait pour m'aider à aller faire un stage à l'Université de Stanford en Californie entre mon Master 1 et mon Master 2. I also want to thank Mary Beth Mudgett for her hospitality during the three-month internship, and the member of the Mudgett Lab especially Jung-Gun Kim, Ken Frame, Kyle Taylor, Franco Errico and Kalyan Mondal for their support when I was far from home. This first professional experience outside of France also allowed me to improve my English (no small challenge, indeed!) personally and scientifically. Thanks!

Je tiens aussi à remercier Martial Briand qui m'a été d'une grande aide pour les études de bioinformatique. Même quand je venais te voir au dernier moment pour te demander des travaux urgents, tu as su te rendre disponible pour mes demandes. Je t'en suis très reconnaissant. Sinon, je te sens ému et j'ai vu que tes yeux brillent depuis que tu as installé une machine virtuelle Windows sur ta machine en Linux. C'était important ! En tout cas, merci beaucoup pour ton aide.

Matthieu Barret « moquette or not moquette, that is the question! », je te remercie pour ta bonne humeur, tu m'as beaucoup fait rire depuis ton arrivée dans l'équipe. Je te remercie aussi pour la relecture critique des papiers et de certaines parties de ce manuscrit.

Je remercie aussi particulièrement Anne Préveaux et Jacky Guillaumes pour leur précieuse aide, notamment pour les tests en tubes capillaires, merci aussi à toi Anne pour les « cocottes » (!!!). Jacky, tu es une source d'inspiration pour de nouvelles idées lors des mises au point, tu m'as beaucoup aidé lors des manips. Anne et Jacky, combien de seringues et aiguilles avons-nous manipulées depuis le début de ma thèse ? Jacky, je t'avais promis de

calculer ça. D'après mes estimations, je dirais qu'on a utilisé 4086 seringues et aiguilles ! En tout cas, sans vous, ma thèse n'aurait pas été celle qu'elle est.

Je remercie les anciens et nouveaux doctorants. Un grand merci particulier à Diane Leforestier avec qui j'ai passé trois ans très agréables. Toutes nos discussions, sérieuses (ou pas), ont structuré les repas du midi que l'on a toujours pris ensemble ! C'était un plaisir de partager tout ça avec toi. Merci à toi pour ton soutien, pour nos sorties très régulières au cinéma (vive Thérèse Desqueyroux et les ch..., tu comprendras... oui juste devant toi !). Diane a un petit talent. Elle est à la pâtisserie, ce que Beethoven est à la musique ! Merci à toi pour toutes ces petites pâtisseries que tu goûtes à peine mais que tu sais faire en grande quantité. C'était vraiment sympa le temps passé avec toi. A poursuivre !

Je tiens aussi à remercier Stéphanie Pochon qui a été très présente lors de mon M2 et de mon début de thèse. Tu m'as très bien guidé et j'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci pour ta pédagogie et ta patience. Pour faire référence à tes remerciements, tu es aussi quelqu'un d'atypique avec qui j'ai bien aimé communiquer. Merci à Céline Rousseau qui a répondu à mes nombreuses questions sur R. Tu t'es toujours rendue disponible pour m'aider, merci à toi (je tiens à préciser que nos vélos nous remercieront plus tard pour ce qu'on a fait pour eux) ! Merci à Amandine Cunty qui m'a accompagné à Shanghai, merci pour ton organisation des visites ! Merci à Déborah Merda pour toutes nos discussions en troisième année de thèse. Et oui, elles sont trop cool les cibles ! Merci à Marie De Gracia, Antoine Abrieux (merci pour tes conseils en photographie), Emiliane Taillebois, Antoni Pellizzaro, Matthieu Gaucher, Thibault Leroy, Gaëlle Laloi, Sandrine Mikol, Emmanuelle Dheilly et aux nouveaux arrivants dont Mylène Ruh, que je n'ai pas eu le temps d'apprendre à connaître, et Samir Rezki. Samir, j'aime ta grande curiosité et tes multiples questionnements.

Je remercie aussi les post-doctorants Perrine David, Erika Charbit et Laurana Serres-Giardi. Laurana tu as su faire preuve de beaucoup de pédagogie dans tes réponses lorsque je venais te poser des questions de bioinformatique.

Je voudrais aussi adresser mes remerciements à mon ancienne équipe avec laquelle j'ai continué de collaborer pour les manips d'expression de gènes de défense. Merci à Marie-Noëlle Brisset (Nat'), Jean-Pierre Paulin (le chef), Roland Chartier (Oui, je pense !!!), Chrystelle Heintz (Patton) et Martine Devaux. Nat' et le chef, merci de m'avoir fait confiance depuis mes premières années d'études supérieures. Roland, j'ai une grande pensée pour toi. Toutes tes blagues vont me manquer, je pense... Je remercie Brice Marolleau (Sarrasin) et

Quentin Barrière pour leur aide apportée pour la puce qPFD tomate. Brice, merci aussi pour les lieux que tu m'as fait découvrir pendant cette troisième année de thèse. Je remercie aussi Thomas Dugé de Bernonville (L'imposteur), maintenant maître de conférences à l'Université de Tours, pour l'inspiration que tu m'as donnée lors de mes premiers pas dans la recherche. Tu es le premier doctorant que j'ai connu, et quel exemple à suivre !

Je remercie aussi particulièrement Thomas Guillemette et Benoit Calmes qui m'ont très bien accompagné lors de ma première année d'enseignement. J'ai beaucoup aimé cette période et vous y avez largement contribué en faisant en sorte qu'elle se déroule le mieux possible. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec vous.

J'adresse mes remerciements à Benjamin Priol (Sulfo), la huitième merveille du monde ! Je te connais depuis la première année de master. Tu es une très belle rencontre. J'ai beaucoup aimé partager avec toi. Nos riches et nombreuses discussions m'intéresseront toujours ! Je tiens aussi à remercier Jean-François Guimbaud. Quelle rencontre ! Nos partages d'idées vont sincèrement me manquer. En plus tu es si svelte !! Merci aussi à Youness Toualbia pour toutes nos sorties et discussions autour de la musique, de la photographie et autres !

Je continue en remerciant les stagiaires et anciens stagiaire Marion Lecerf (merci pour ton premier cours en photographie qui m'a donné l'envie de continuer !), Camille Li-Marchetti, Agathe Joffre, Maria Zakir, Emeline Théard, Mbaye Adama, Hélène Peteul, Jocelyn Chené, Betty Arnaud, Wesley Delage, Enora Dupas, Félix Mil, Camille Guerin, Ziyi Miao, Maude Jacquél et Sofia Filahi qui ont participé à la bonne humeur dans l'équipe EmerSys.

Je poursuis en remerciant Laurent Noël et Claudine Zischek pour avoir partagé leurs techniques et conseils en biologie moléculaire avec moi. Laurent, merci pour nos discussions intéressantes et ton côté générateur d'idées innovantes, merci aussi pour tes relectures et corrections.

Merci à la plateforme IMAC pour leur sympathie et leur compétence dont Marjorie Juchaux, Fabienne Simonneau et Mayeul Milien pour toutes leurs explications.

Je remercie l'équipe INEM et Sylvain Hanteville qui font un boulot difficile. Je remercie en particulier, Joël Bénard (récemment parti à la retraite), Nicolas Dousset, Jacky Granger, Michael Anjuere et Rémi Gardet pour m'avoir fourni des semis et s'être occupés de la maintenance des enceintes de culture : « pas d'plantes, pas d'manip ! ».

Je remercie également les acheteurs Sophie Cesbron, Géraldine Taghouti, Jacky Guillaumes, Christelle Brin pour leur disponibilité. Merci aussi à Perrine Portier et à Marion Le-Saux pour m'avoir fourni des souches de la CFBP.

Merci à Raphaël Cournol et Thibault Clochard pour leur aide lors des premières électroporations.

Merci à Audrey Lathus pour sa précieuse aide à la salle des milieux.

Je remercie Anne Caudron, qui, lorsqu'elle était là, m'a beaucoup fait rire. J'ai bien aimé discuter de ton passé avec toi. J'ai aussi aimé fêter tes anniversaires au restaurant, tu as vraiment été quelqu'un que j'ai beaucoup apprécié. Merci à toi pour tout ça. Merci aussi à Patricia Raffoux, Sylvie Bourel, Patricia Vandaële, Mélissa Lannois, Magali Tabuteau, Valérie Le Mignon et Valérie Hie pour leur aide sur le côté administratif.

Merci à Malika Zaouali, Christine Saulais et Liliane Guillot.

En troisième année de thèse, j'ai participé aux Doctoriales, au Croisic. C'est une formation pendant laquelle nous avons un projet de création d'entreprise innovante à réaliser en 24 heures. Cela m'a donné l'occasion de rencontrer et de communiquer avec beaucoup de doctorants de toutes les disciplines (droit, littérature, histoire, informatique, physique, biologie...). Les échanges d'idées avec des doctorants ayant des formations très différentes de la mienne ont été pour moi une expérience plus que positive ! Je conseille vivement cette formation aux suivants, c'est l'occasion de sortir son nez du laboratoire et de préparer son futur. Je tiens à remercier tout particulièrement Anaïs Boulard d'être allée aux Doctoriales. J'ai ainsi pu te rencontrer et quelle magnifique rencontre ! Merci. Tu es quelqu'un avec qui j'aimerais garder le contact !

Un merci particulier à mon ancien prof de SVT, Hervé Deshaies, du lycée Renaudeau de Cholet. Il se rappelle sûrement de moi et m'a donné le goût de la biologie ! Merci aussi à

Bruno Durand et les autres profs du lycée Jean Moulin d'Angers pour m'avoir donné le goût de la microbiologie.

Je remercie chaleureusement Odrade Nougé pour tout ce que l'on partage quotidiennement. Tu me donnes beaucoup de soutien et j'aime le temps que l'on passe ensemble. J'ai envie de dire : vivement nos futurs voyages en Islande, en Asie et à l'Ile de la Réunion ! Je te souhaite aussi bon courage pour ta fin de thèse.

Mes plus grands remerciements iront à ma famille proche. Merci à mes parents, mon frère et Anaïs, Odrade et merci à mes grands-parents. Je vous remercie tous pour votre présence à tous moments. Vous m'avez toujours soutenu durant tout mon parcours. Vous avez toujours été là pour moi et vous avez toujours cru en moi. Je vous en remercie et je vous en suis reconnaissant !

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	8
Abréviations	11
Introduction générale.....	14
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	18
1. Phyllosphère	19
1.1. Définition	19
1.2. Topographie des feuilles et sites de colonisation par les bactéries	20
1.2.1. Trichomes	20
1.2.2. Cuticule	21
1.2.3. Epidermes supérieur, inférieur, stomates et parenchymes	21
1.2.4. Vaisseaux du xylème et du phloème	22
1.3. Caractéristiques environnementales de la phyllosphère.....	23
1.3.1. Facteurs physiques, environnementaux et survie des bactéries	23
1.3.2. Disponibilité en nutriments dans la phyllosphère	25
2. Types d'interactions plantes/bactéries et défense des plantes	27
2.1. Interaction non-hôte, incompatibilité de base ou résistance non-hôte	27
2.2. Interaction hôte, compatibilité de base (maladie)	28
2.3. Interaction hôte, incompatibilité spécifique ou résistance hôte	28
2.4. Défenses mises en place par les plantes	29
3. Perception, adaptation des bactéries à l'hôte et déterminants du pouvoir pathogène	31
3.1. Le tactisme chez les bactéries	31
3.1.1. Détection de signaux par les Methyl-Accepting Chemotaxis Proteins (MCP) ..	32
3.1.1.1. Domaines fonctionnels et rôle des MCP	32
3.1.1.1.1. Les chémorécepteurs	33
3.1.1.1.2. Les récepteurs tactiques pour l'énergie	33
3.1.1.2. Organisation spatiale et répartition des MCP	34
3.1.1.3. Distribution des gènes codants les MCP	35
3.1.1.4. Evolution des domaines fonctionnels MA et senseurs des MCP.....	35
3.1.2. Transduction du signal chimiotactique	36
3.1.2.1. Mécanismes	36
3.1.2.2. Rôle du chimiotactisme dans la colonisation de l'hôte.....	37

3.2.	Mobilité flagellaire	38
3.2.1.	Biosynthèse et structure du flagelle	39
3.2.2.	Organisation et régulation des gènes flagellaires	40
3.2.3.	Rôle du flagelle dans la colonisation de l'environnement	41
3.3.	Autres types de mobilité	42
3.4.	Adhésion et formation de biofilm, installation des bactéries sur leur hôte	43
3.5.	Système de sécrétion de type III et effecteurs de type III, déterminants de la multiplication des bactéries phytopathogènes sur leur hôte	45
4.	Bactéries du genre <i>Xanthomonas</i> , modèles de l'étude	48
4.1.	Caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques	48
4.2.	Caractéristiques génomiques	49
4.3.	Phylogénie et taxonomie des <i>Xanthomonas</i>	50
4.4.	Hôtes et maladies	51
4.4.1.	<i>Xanthomonas campestris</i> , focus sur <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> et leurs hôtes les <i>Brassicaceae</i>	52
4.4.1.1.	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	52
4.4.1.2.	<i>Brassicaceae</i>	53
4.4.1.2.1.	Généralités	53
4.4.1.2.2.	Cas particulier de l'arabette	54
4.4.1.2.3.	Les glucosinolates	54
4.4.2.	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> , <i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> et leur hôte <i>Phaseolus vulgaris</i>	56
4.4.2.1.	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> et <i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i>	56
4.4.2.2.	<i>Phaseolus vulgaris</i>	57
	Enjeux et objectifs de la thèse	58
	Chapitre 2 : Distribution et diversité des senseurs du chimiotactisme chez les <i>Xanthomonas</i>	60
1.	Introduction	61
2.	Diversity and distribution of chemotaxis sensors in xanthomonads	62
	Chapitre 3 : Rôle d'un senseur du chimiotactisme dans la spécificité d'hôte de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	103
1.	Introduction	104
2.	A single chemotaxis sensor defines <i>Xanthomonas campestris</i> host range and restrict it to <i>Brassicaceae</i>	105
3.	Résultats complémentaires	138
3.1.	Introduction	138
3.2.	Matériels et méthodes	139
3.3.	Résultats	139

3.4. Discussion	140
Chapitre 4 : Mobilité des <i>Xanthomonas</i> et genèse d'une souche non flagellée	141
1. Introduction	142
2. Genome sequence of <i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads.....	143
3. Draft genome sequence of the flagellated <i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> strain CFBP 4884.....	173
4. Résultats complémentaires.....	175
4.1. Matériels et méthodes.....	175
4.2. Résultats	175
4.3. Discussion	176
Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives	178
1. Les <i>Xanthomonas</i> ont un nombre élevé de gènes codant les MCP.....	179
2. Hsb1 est présent dans un seul clade chez les <i>Xanthomonas</i>	181
3. <i>hsb1</i> est localisé dans la cassette d'un intégron	182
4. Hsb1 contient un domaine PAS cytoplasmique	184
5. Le chimiotactisme et Hsb1 interviennent pour permettre la pénétration de <i>Xcc</i> ATCC 33913 dans les tissus des plantes hôtes	185
6. Hsb1 n'élucide pas les réactions de défense de la tomate, plante non-hôte de <i>Xcc</i>	187
7. Hsb1 détecte la sinigrine et la L-phénylalanine mais <i>Xcc</i> ne métabolise aucune des deux molécules.....	188
8. <i>hsb1</i> de <i>Xcc</i> 8004 est induit par HrpG	189
9. La mobilité n'est pas une capacité générale des <i>Xanthomonas</i>	191
10. Perspectives	192
Références bibliographiques	194

Abréviations

ABA : Acide Abscissique

ABRC : Arabidopsis Biological Resource Center

BL : Brassinolides

Cache : Ca²⁺ channels and chemotaxis receptors

CHASE : Cyclase/Histidine kinase-Associated Sensing Extracellular

DAMP : Damage-Associated Molecular Patterns

DSF : Diffusible Signal Factor

ERIC : Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

E. coli : *Escherichia coli*

EPS : ExoPolySaccharide ou Extracellular PolySaccharide

ET : EThylen

ET3 : Effecteur de Type III (T3E: Type III Effector)

ETI : Effector-Triggered Immunity

ETS : Effector-Triggered Susceptibility

FAD : flavine adenine dinucleotide

FMN : flavine mononucleotide

GA : Acide Gibbérellique

GAF : cGMP-dependent phosphodiesterase, Adenylyl cyclases, and *E. coli* FhlA (formate hydrogen lyase transcriptional activator)

GL : Genetic Lineage

HAMP : Histidine kinases, Adenylyl cyclases, Methyl-accepting chemotaxis proteins, and Phosphatases

HR : Hypersensitive Response

hrc : hypersensitive response and pathogenicity (*hrp*) conserved

hrp : hypersensitive response and pathogenicity

JA : Jasmonic Acid

LBR : Ligant-Binding Region
 MA : Methyl-Accepting
 MAMP : Microbe-Associated Molecular Patterns
 Mb : Méga bases
 MCP : Methyl-accepting chemotaxis protein
 MEB : Microscope Electronique à Balayage (SEM)
 MET : Microscope Electronique à Transmission (TEM)
 MLSA : MultiLocus Sequence Analysis
 MLST : MultiLocus Sequence Typing
 MLVA : MultiLocus VNTRs Analysis
 MPa : mégapascal (1 MPa = 10^6 Pa)
 MTI : MAMP-Triggered Immunity
 NASC : The European Arabidopsis Stock Centre
 OGM : Organisme Génétiquement Modifié
 PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns
 PAS : Period circadian protein, Ah receptor nuclear translocator protein, Single-minded protein
 PMF : Proton Motive Force
 PR : Pathogenesis-related Protein
Pst : *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
 PTI : PAMP-Triggered Immunity
 PYP : Photoactive Yellow Protein
 REP : Repetitive Extragenic Palindromic
 ROS : Reactive Oxygen Species
 SA : Salicylic Acid
 SAR : Systemic acquired resistance
 SST3 : Système de Sécrétion de Type III (T3SS : Type III Secretion System)
 TAIR : The Arabidopsis Information Resource
 TAL : Transcriptional Activator-Like
 TBDT : TonB-Dependent Transporters
 TFP : Type IV pilus
 UFC : Unité Formant Colonie

UV : Ultra-Violet

VNTR : Variable Number Tandem Repeat

Xap : *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Xcc : *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Xci : *Xanthomonas campestris* pv. *incanae*

Xcr : *Xanthomonas campestris* pv. *raphani*

Xff : *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*

Introduction générale

Les bio-agresseurs des plantes d'intérêt agronomique ou ornemental sont la cause d'importantes pertes économiques. Lutter contre ces bio-agresseurs est un enjeu mondial majeur. Au niveau international, les principales méthodes de lutte contre les insectes nuisibles, les champignons et bactéries phytopathogènes des plantes d'intérêt économique sont chimiques (insecticides, confusion chimique, pesticides, antibiotique...), génétiques (sélection variétale, organismes génétiquement modifiés (OGM)), culturales, en étant curatives ou prophylactiques. En France, l'utilisation d'OGM et d'antibiotiques est interdite par la loi pour lutter contre les bactéries phytopathogènes. En 2008, l'élaboration du plan Ecophyto 2018 par le Grenelle de l'environnement vise à sécuriser les pratiques de distribution et d'application et à réduire de 50 % l'usage de pesticides sur 10 ans (Ministère de l'agriculture et de la pêche, 2008). Ce plan vise aussi à élargir l'utilisation de méthodes de luttés alternatives. En l'absence de méthodes de lutte chimique efficace et autorisée en France, la lutte contre les bactéries phytopathogènes est essentiellement prophylactique. Cette lutte comprend l'ensemble des techniques visant à éviter l'introduction de l'organisme, réduire sa densité d'inoculum et limiter sa dispersion. Afin d'élargir les possibilités de lutte, une meilleure connaissance de l'écologie des bactéries et de l'épidémiologie des maladies est primordiale. En effet, la connaissance des mécanismes qui amènent une bactérie à être pathogène sur son hôte et à se propager est importante pour lutter et agir de manière ciblée.

Les *Xanthomonas* sont des bactéries associées aux plantes dont la plupart sont connues pour être phytopathogènes. Ces bactéries colonisent et/ou attaquent les parties aériennes des plantes. Une des activités de l'équipe EmerSys (Emergence, systématique et écologie des bactéries associées aux plantes) concerne l'étude des déterminants de la spécificité d'hôte des *Xanthomonas*. La gamme d'hôte est définie comme étant l'ensemble des hôtes qu'une bactérie est capable de coloniser lors de son cycle biologique (Kirzinger et Stavrínides, 2012). Les étapes de l'interaction de ces bactéries avec leur hôte sont les suivantes : (i) attraction de la bactérie par la plante hôte (chimiotactisme et mobilité flagellaire), (ii) installation dans la phyllosphère de la plante hôte (adhésion), (iii) multiplication *in planta* et éventuellement expression du pouvoir pathogène, (iv) dispersion et transmission de la bactérie à d'autres plantes hôtes ou organes végétaux. L'hypothèse formulée dans l'équipe est que la spécificité d'hôte correspond à une adaptation fine des bactéries phytopathogènes en interaction avec leur hôte. Des travaux précédents conduits dans cette équipe ont montré que des adhésines non fibrillaires interviennent dans différentes étapes de la colonisation de la phyllosphère de l'hôte (adhésion aux surfaces abiotiques, formation de biofilm...) et dans la transmission à la graine de bactéries

phytopathogènes (Darsonval *et al.*, 2009). Hajri et collègues (2009) montrent que le répertoire d'effecteurs de type III est corrélé à la spécificité d'hôte de ces bactéries phytopathogènes. Mhedbi-Hajri et collègues (2011) montrent que le répertoire de senseurs et d'adhésines corrèle également avec le regroupement des souches en pathovars. Un pathovar est défini comme une division infrasubspécifique rassemblant les souches bactériennes qui induisent un même type de symptôme sur une même gamme d'hôte (Young *et al.*, 1978; Young, 2008).

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé à la première étape de la colonisation de l'hôte et j'ai cherché à démontrer le rôle du chimiotactisme et de la mobilité flagellaire dans la colonisation de l'hôte et la spécificité d'hôte des *Xanthomonas*. Le chimiotactisme regroupe les mécanismes par lesquels les bactéries qui en sont équipées sont attirées ou repoussées par un signal (chimique ou énergétique). D'après Mhedbi-Hajri et collègues (2011), le répertoire de senseurs chimiotactiques des différents pathovars de l'espèce *X. campestris* est identique, sauf pour un senseur (XCC0324). Ce senseur est présent chez *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) et *X. campestris* pv. *raphani* (*Xcr*), mais absent de *X. campestris* pv. *incanae* (*Xci*). *Xcc* et *Xcr* sont pathogènes d'une large gamme de *Brassicaceae*. *Xci* n'est pathogène que de *Matthiola incana*, la giroflée. Ce senseur, XCC0324, est-il impliqué dans l'élargissement de la gamme d'hôte de *Xcc* et *Xcr* par rapport à *Xci* ? Lors de ma thèse, je me suis focalisé sur la validation fonctionnelle de cette hypothèse. Est-ce qu'une souche délétée de XCC0324 est toujours tactique ? Quel est son comportement sur plantes hôtes et sur plantes non-hôtes ? Quel(s) signal(aux) est(sont) détecté(s) par XCC0324 ? Je me suis également intéressé d'une manière plus générale à la distribution des senseurs du chimiotactisme chez les *Xanthomonas*, à leur nombre par souche, à leur localisation dans les génomes. Ces questions font l'objet des chapitres deux et trois de ce manuscrit présentant deux articles en préparation qui interviennent après un premier chapitre de synthèse bibliographique.

Lors de l'analyse de la séquence génomique de la souche 4834-R de *X. fuscans* subsp. *fuscans* (*Xff* 4834-R) coordonnée par l'équipe Emersys, il est apparu que cette souche présentait une importante délétion dans le cluster de gènes codant le système flagellaire, le rendant non fonctionnel. Ce résultat était surprenant car dans la littérature, il est communément admis que les *Xanthomonas* sont mobiles grâce à leur flagelle polaire, caractéristique qui leur conférerait de nombreux avantages et participerait au pouvoir pathogène. Aussi, nous nous sommes interrogés sur la fréquence de cet événement dans les populations de cet organisme et plus largement des *Xanthomonas*. C'est pourquoi nous avons

entrepris l'étude de la distribution des gènes codant le système flagellaire dans une collection de plus de 300 souches représentant la diversité des *Xanthomonas*. Cette étude compose une partie de l'article publié dans BMC Genomics (Darrasse *et al.*, 2013) dont je suis co-auteur. Cette souche non flagellée avait été isolée en même temps que des souches flagellées lors d'une épidémie en 1998 dans une parcelle à Beaucouzé dans le Maine et Loire (France). Nous avons fait séquencer le génome d'une de ces souches flagellées et avons procédé à une analyse comparative des génomes de ces deux souches (*Xff* 4834-R et *Xff* CFBP 4884). Cette analyse nous a permis de formuler des hypothèses quant à l'émergence de souches non flagellées dans le genre *Xanthomonas*. Le génome de la souche *Xff* CFBP 4884 a été publié dans la revue Genome Announcements (Indiana *et al.*, 2014). Ces deux articles font l'objet du quatrième chapitre de ce manuscrit de thèse.

Je conclurai ce manuscrit par une discussion générale portant sur l'analyse de mes travaux de thèse, les réponses qu'ils ont apportées aux questions posées et les nouvelles interrogations qu'ils soulèvent.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

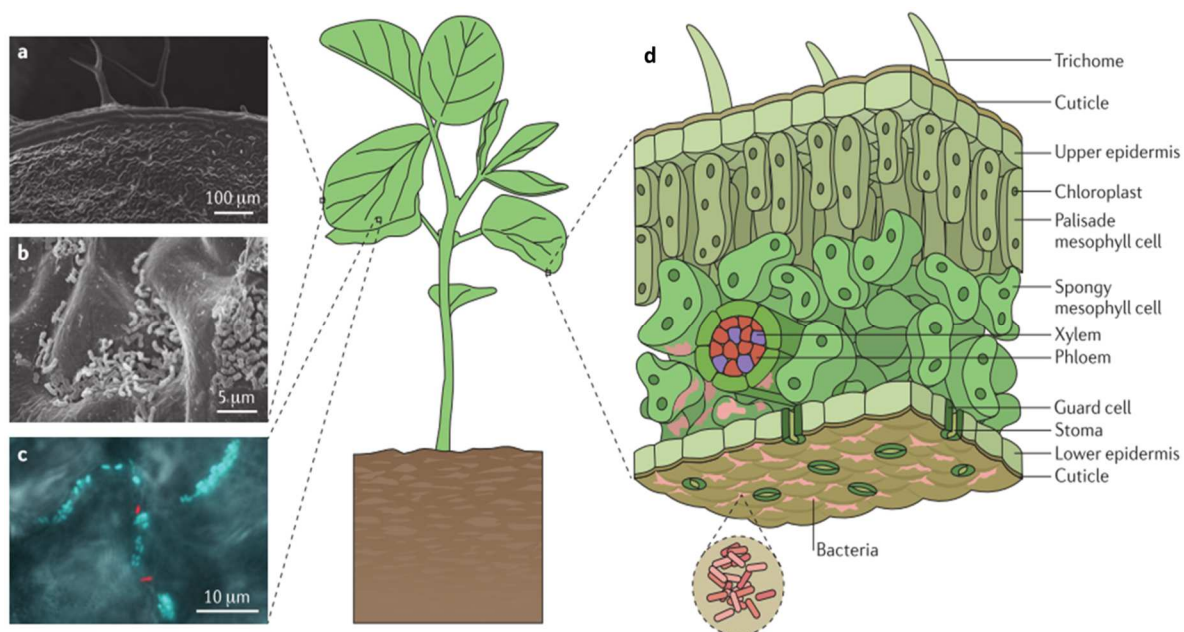


Figure 1.1 : Phyllosphère et topographie des feuilles. (a) Photographie de trichomes de feuille d'*Arabidopsis thaliana* au microscope électronique à balayage. (b) Photographie des bactéries épiphytes *Sphingomonas* sp. Fr 1 à la surface de la feuille. Les bactéries sont situées dans les cavités formées par les jonctions des cellules épidermiques de plantes. (c) Photographie au microscope à épifluorescence de *Pantoea agglomerans* 299R exprimant constitutivement *cfp* (cyan fluorescent protein) et *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 exprimant *mCherry* (red fluorescent protein), sur des feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. (d) Représentation de la coupe transversale d'une feuille montrant les différents tissus et structures vasculaires (d'après Vorholt, 2012).

Tableau 1.I : Liste des interactions interspécifiques et bilans pour les différents partenaires de l'interaction (d'après Bronstein, 1994).

		Bilan pour l'espèce 2		
		Positif	Négatif	Neutre
Bilan pour l'espèce 1	Positif	Mutualisme		
	Négatif	Prédation/Parasitisme	Compétition	
	Neutre	Commensalisme	Amensalisme	Neutralisme

1. Phyllosphère

1.1. Définition

La phyllosphère (figure 1.1) est définie comme étant un micro-écosystème, constitué de la feuille et de l'environnement qui est soumis à son influence (Hirano et Upper, 2000). Généralement chez les plantes, la plus grande surface des parties aériennes est composée par les feuilles (Vorholt, 2012). Sur Terre, la surface des feuilles est la plus grande interface biosphère-atmosphère. Elle est estimée à $1\,017\,260\,200\text{ km}^2$, soit approximativement deux fois la surface de la Terre (Woodward et Lomas, 2004; Vorholt, 2012). La phyllosphère constituant un habitat pour les microorganismes est d'intérêt pour les microbiologistes pour l'étude de l'autécologie, l'écologie des populations, la dynamique des populations et la compétition (Meyer et Leveau, 2012). Les bactéries sont de loin les colonisateurs les plus nombreux de la phyllosphère (Etrews et Harris, 2000; Leveau, 2006; Redford *et al.*, 2010; Meyer et Leveau, 2012). Elle héberge aussi des archées, des champignons filamenteux, des levures, des algues, des protozoaires, des nématodes et des insectes (Lindow et Leveau, 2002; Lindow et Brandl, 2003). Sur Terre, le nombre total de cellules procaryotes a été estimé de 4 à 6×10^{30} . Cela représente de $3,5$ à $5,5 \times 10^{17}$ g de carbone (Whitman *et al.*, 1998). La population bactérienne de la phyllosphère est estimée supérieure à 10^{26} cellules bactériennes. A la surface de la feuille, la population bactérienne est de l'ordre de 10^6 à 10^7 voire de 10^4 à 10^8 unités formant colonies (UFC)/cm² de surface foliaire (Bulgarelli *et al.*, 2013). Chez *Arabidopsis thaliana*, une étude montre qu'il y a $5,4 \times 10^6$ UFC par cm² de surface foliaire. Cela représente $1,5 \times 10^8$ UFC par gramme de poids frais (Remus-Emsermann *et al.*, 2014). Ces colonisateurs peuvent avoir une interaction négative, positive ou neutre (tableau 1.I) pour la plante comme c'est le cas par exemple des agents pathogènes ou au contraire de microorganismes protégeant la plante de la colonisation par les agents pathogènes alors que d'autres n'auront pas d'effet sur l'hôte (Bronstein, 1994; Casadevall et Pirofski, 2000; Kishore *et al.*, 2005; Redford *et al.*, 2010; Peñuelas et Terradas, 2014).

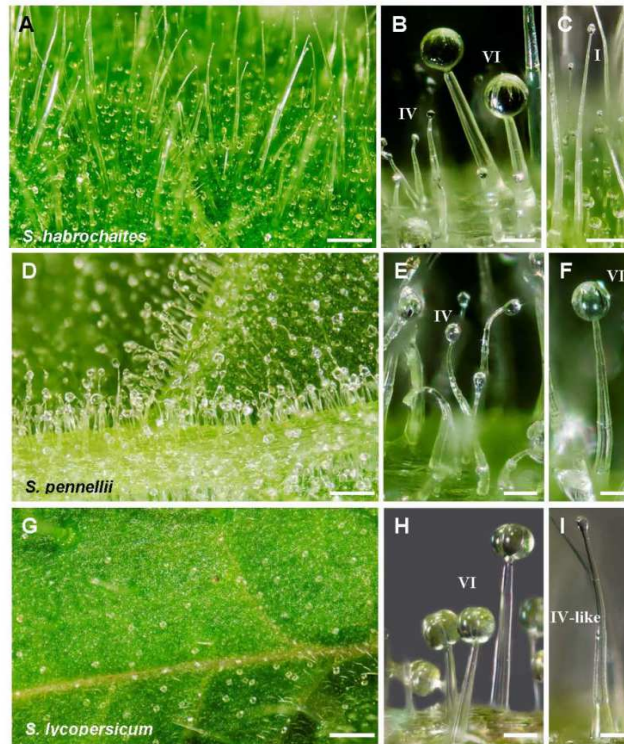


Figure 1.2 : Trichomes glandulaires de *Lycopersicon* (d'après Glas *et al.*, 2012).

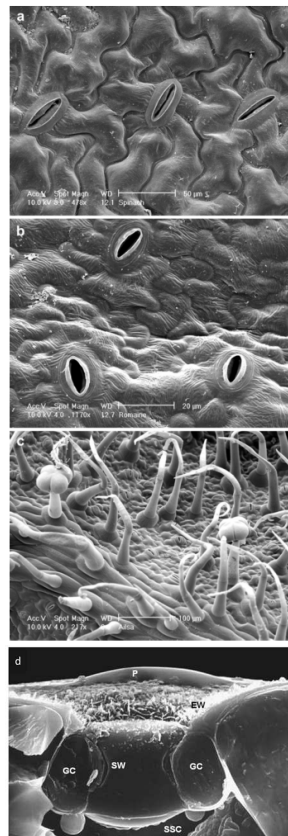


Figure 1.3 : Photographies au microscope électronique à balayage de stomates de feuilles d'épinard (a), de stomates de feuilles de laitue Romaine (b) et de trichomes de feuilles de tomate (c) (d'après Sirinutsomboon *et al.*, 2011). Photographie de stomate d'*Allium cepa* en microscopie électronique à cryo-balayage. Epicuticular waxes (EW), guard cells (GC), stomatal wall (SW), substomatal cavity (SSC), and particle (P). La dimension du pore est de l'ordre de 15 μm (d) (Burkhardt, 2010).

1.2. Topographie des feuilles et sites de colonisation par les bactéries

La surface foliaire n'est ni uniforme ni régulière. Elle peut être comparée à un paysage montagneux composé de pics (trichomes), de vallées (dessinées par les vaisseaux), de cavités (stomates, hydathodes) et de plaines (limbe foliaire) (figure 1.1) (Hirano et Upper, 2000; Beattie, 2002; Lindow et Brandl, 2003; Shepherd et Wagner, 2007). En général, les bactéries sont majoritairement réparties à la face inférieure des feuilles probablement parce que la quantité de stomates ou trichomes y est plus élevée ou que la cuticule est plus fine (Leben, 1988; Beattie et Lindow, 1999). Les sites les plus communément colonisés sont situés dans des cavités comme les jonctions de la paroi cellulaire de l'épiderme (Blakeman, 1985; Davis et Brlansky, 1991; Leveau et Lindow, 2001; Sirinutsomboon *et al.*, 2011), le long des nervures (Leben, 1988; Mariano et McCarter, 1993), à l'entrée et dans les stomates (Mew et Vera-Cruz, 1986; Mariano et McCarter, 1993) et à la base des trichomes (Mew et Vera-Cruz, 1986; Mariano et McCarter, 1993). Elles peuvent aussi être localisée sous la cuticule, dans les dépressions de la cuticule, à proximité ou dans les hydathodes (Mansvelt et Hattingh, 1987; Hugouvieux *et al.*, 1998; Whipps *et al.*, 2008).

1.2.1. Trichomes

Les trichomes (figures 1.2 et 1.3) sont des excroissances épidermiques, poils situés sur l'épiderme des feuilles et sur d'autres organes végétaux (Schilmiller *et al.*, 2008). Les trichomes peuvent être ramifiés ou non (Payne *et al.*, 1978; Wagner, 1991; Hülkamp et Schnittger, 1998). Les trichomes glandulaires sont retrouvés chez environ 30 % des plantes vasculaires (Fahn, 2000; Glas *et al.*, 2012). Ils ont la capacité de produire, stocker et sécréter de grandes quantités de métabolites secondaires de différentes classes (Wagner, 1991; Yadav *et al.*, 2005; Glas *et al.*, 2012; Ramirez *et al.*, 2012; Tissier, 2012), tels que des terpénoïdes (Aharoni *et al.*, 2006), des phénylpropanoïdes (Schilmiller *et al.*, 2008), des acides gras, des sucres, des alcaloïdes (dérivés d'acides aminés) et des protéines (Yadav *et al.*, 2005; Schilmiller *et al.*, 2008; Sallets *et al.*, 2014). La diversité et la quantité de ces métabolites secondaires sécrétés sont variables en fonction des plantes et de leur stade physiologique. Ils peuvent avoir des activités anti-oxydantes ou antimicrobiennes (Karamanoli *et al.*, 2005; Sallets *et al.*, 2014).

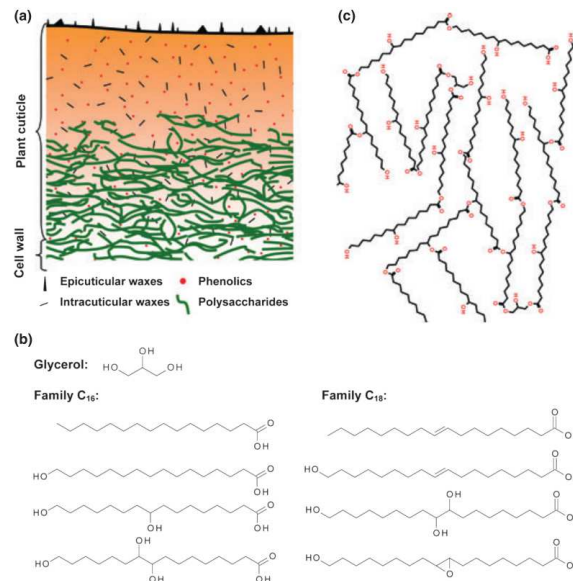


Figure 1.4 : (a) Schéma représentant la structure et les composants principaux d'une coupe transversale de la cuticule. (b) Glycérol, monomères C16 et C18 majeurs de la cutine. (c) Représentation schématique du réseau de molécules formant la cutine (d'après Dominguez *et al.*, 2011).

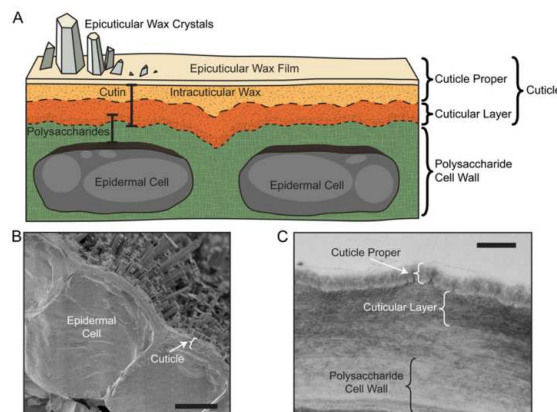


Figure 1.5 : Structure de la cuticule des plantes. (A) Schéma de la structure principale de la cuticule. (B) Photographie au microscope électronique à balayage de la cuticule et de cellules épidermiques d'*Arabidopsis*. La barre d'échelle mesure 5 μ m. (C) Photographie au microscope électronique à transmission de la paroi cellulaire épidermique d'une tige d'*Arabidopsis*. La barre d'échelle mesure 500 nm (d'après Yeats et Rose, 2013).

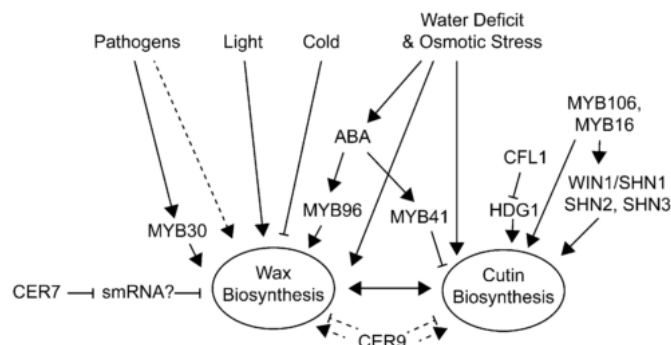


Figure 1.6 : Régulation de la biosynthèse de la cuticule. Résumé de l'interaction de gènes codant des protéines régulatrices et de facteurs environnementaux connus pour influencer la biosynthèse de cutine et de cire (d'après Yeats et Rose, 2013).

1.2.2. Cuticule

La cuticule constitue la surface de la feuille (Domínguez, Cuartero, *et al.*, 2011; Domínguez, Heredia-Guerrero, *et al.*, 2011). Elle est présente aussi bien sur la face supérieure et qu'en face inférieure, tout en étant plus épaisse à la face supérieure (Beattie et Lindow, 1999; Whipps *et al.*, 2008). La cuticule est essentiellement composée de cutine et de cire. La cutine est une matrice composée d'un bio-polymère de type polyester, constitué d'acides gras hydroxy et époxy-hydroxy C16 et C18 et de glycérol (figure 1.4 et 1.5) (Wang *et al.*, 2011). La cire, quant à elle, est constituée d'acides gras avec de très longues chaînes carbonées allant de C24 à C26 et contenant quelques dérivés ou modifications (Wang *et al.*, 2011). Comme pour les trichomes, la composition en molécules de la cire et de la cutine varie en fonction de l'espèce végétale (Barclay *et al.*, 2007; Koch *et al.*, 2008). Par exemple, la surface des plantes de la famille des *Bromeliaceae* absorbe l'eau. Au contraire, la surface foliaire du lotus (*Nelumbo nucifera*) ou du taro (*Colocasia esculenta*) est hyperhydrophobe. Ces feuilles sont autonettoyantes. Le ruissellement de l'eau enlève les poussières et débris sur son passage (Koch *et al.*, 2008). La biosynthèse de cutine et de cire est induite par un déficit en eau ou par un stress osmotique (Yeats et Rose, 2013). Formant une barrière hydrophobe et limitant la perméabilité de la feuille, la cuticule améliore la résistance des plantes à la perte d'eau et au stress osmotique, *via* l'induction de la biosynthèse d'acide abscissique (ABA) (Riederer, 2006; Wang *et al.*, 2011). La lumière induit la biosynthèse de cire tandis que le froid l'inhibe (figure 1.6) (Yeats et Rose, 2013). Des nutriments et de l'eau peuvent passer par diffusion passive de l'intérieur de la feuille vers sa surface. Plus la cuticule est épaisse, moins les nutriments peuvent passer. La survie des bactéries épiphytes, due à la disponibilité en nutriments, est donc influencée par l'épaisseur de la cuticule (Hirano et Upper, 2000; Beattie, 2002; Lindow et Brandl, 2003; Müller et Riederer, 2005; Yadav *et al.*, 2005). C'est au niveau de la cuticule que l'adhésion des cellules bactériennes épiphytes se fait.

1.2.3. Epidermes supérieur, inférieur, stomates et parenchymes

Les épidermes supérieur et inférieur des feuilles sont situés juste en dessous de la cuticule. Les stomates (figure 1.1 et 1.3) sont des cavités majoritairement réparties sur la face inférieure de la feuille (Yadav *et al.*, 2005). Les stomates servent à contrôler les échanges d'eau (par transpiration) (Barrs, 1971; Bunce, 1996) et de gaz (comme le dioxygène O₂ ou le dioxyde de carbone CO₂) entre l'intérieur de la plante et l'environnement (Vorholt, 2012). Le cycle de l'eau

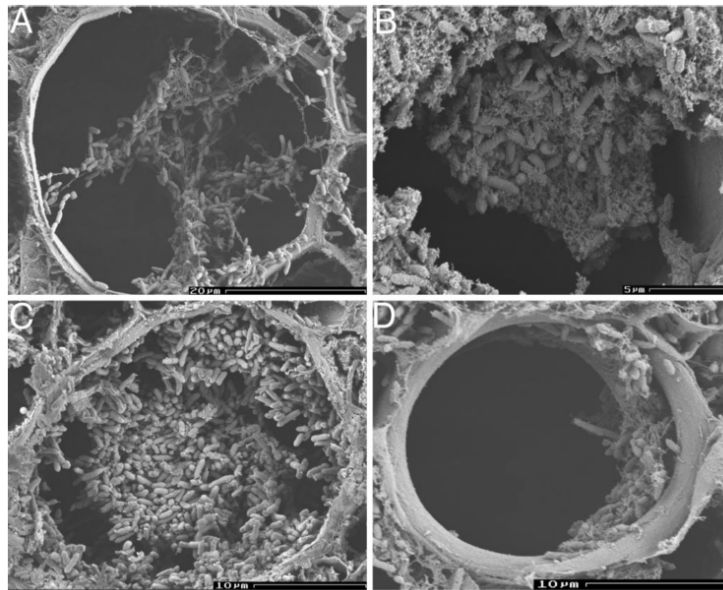


Figure 1.7 : Photographie de microscopie électronique à balayage illustrant la colonisation des vaisseaux du xylème de feuilles de maïs doux par *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. (A et B) Souche sauvage DC283. (C) Souche mutante ESN51, délétée du gène *esaI* est réprimée dans la biosynthèse d'EPS. (D) Souche mutante ESN51R, délétée du gène *esaR* produit de grandes quantités d'EPS. Les images sont des coupes de xylème infecté. Barres d'échelle : (A) 20 μm , (B) 5 μm , (C et D) 10 μm (d'après Koutsoudis *et al.*, 2006).

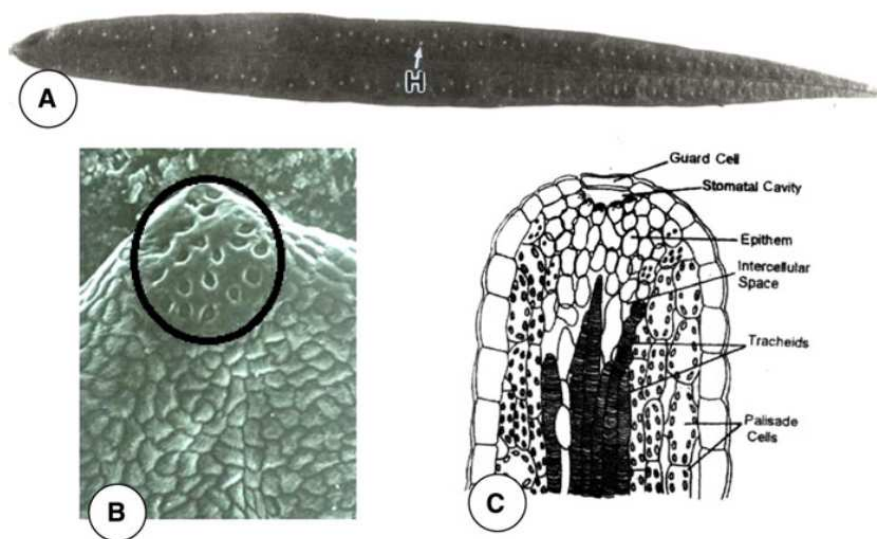


Figure 1.8 : Caractéristiques internes et externes des hydathodes. (A) Hydathodes sur la surface adaxiale de la feuille, dispersés et arrangés de manière linéaire entre la nervure centrale et la marge de feuille de *Ficus formosana* Maxim. f. *Shimadai* Hayata. (B) Grossissement d'hydathodes groupés (encadrés). (C) Schéma d'une coupe longitudinale d'un hydathode (d'après Chen et Chen, 2005 ; Singh et Singh, 2013).

et du carbone passe majoritairement par les stomates. Les précipitations annuelles mondiales sont de l'ordre de $110\,000\text{ km}^3$ (soit $110 \times 10^{15}\text{ kg}$). L'évapotranspiration et la transpiration sont de l'ordre de $70 \times 10^{15}\text{ kg}$ (Jackson *et al.*, 2001; Hetherington et Woodward, 2003). La fermeture des stomates est, entre autres, régulée par la lumière. Lors d'un stress lumineux, la concentration en Ca^{2+} du cytoplasme augmente et induit la fermeture des stomates (O'Carrigan *et al.*, 2014). Par ailleurs, plus l'humidité relative est basse (Diachun et Valteau, 1939), plus la concentration en CO_2 est élevée (Negi *et al.*, 2014) ou plus la concentration en acide abscissique (ABA) augmente (Giday *et al.*, 2014), plus les stomates se ferment. Le contrôle de la fermeture des stomates permet aux plantes de mieux résister à la sécheresse (Hu *et al.*, 2006; Savchenko *et al.*, 2014), à la dessiccation (Giday *et al.*, 2014; Negi *et al.*, 2014) et à l'entrée des agents pathogènes dans les tissus (Gudesblat *et al.*, 2009; Büttner et Bonas, 2010). La bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* synthétise la coronatine, une toxine, qui mime les effets du méthyl jasmonate, une hormone végétale induisant l'ouverture des stomates, ce qui *in fine* permet à la bactérie d'entrer dans les tissus de la plante hôte (Melotto *et al.*, 2006; Underwood *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013). Le parenchyme palissadique est situé sous l'épiderme supérieur tandis que le parenchyme lacuneux est localisé au-dessus de l'épiderme inférieur (figure 1.1). Il est riche en chloroplastes qui sont le siège de la photosynthèse (Allen *et al.*, 2011; Jensen et Leister, 2014). La photosynthèse consiste à la transformation de l'énergie lumineuse et de la matière inorganique (eau (H_2O) et dioxyde de carbone (CO_2)) en matière organique et en O_2 (Renger, 2010; Allen *et al.*, 2011). Les organes photosynthétiques, essentiellement les feuilles, sont appelés des organes sources car ils constituent une zone de production de matière organique. Cette matière est redistribuée aux organes puits *via* la sève élaborée transportée par les vaisseaux du phloème (Lemoine *et al.*, 2013). Les composés synthétisés lors de la photosynthèse sont redistribués depuis leurs sites de synthèse jusqu'aux éléments des vaisseaux du phloème. Pour cela, soit ils passent par la voie symplastique, soit par la voie apoplastique (Turgeon, 1989; Steudle et Frensch, 1996; Buckley, 2014). Ces deux voies font respectivement référence aux plasmodesmes (petits canaux cytoplasmique entre cellules) et aux espaces libres extracellulaires ils passent de cellule à cellule *via* de petits canaux cytoplasmiques.

1.2.4. Vaisseaux du xylème et du phloème

Les vaisseaux du xylème et du phloème permettent respectivement le transport de la sève brute (eau et sels minéraux) et de la sève élaborée (eau, lipides, glucides, acides aminés...)

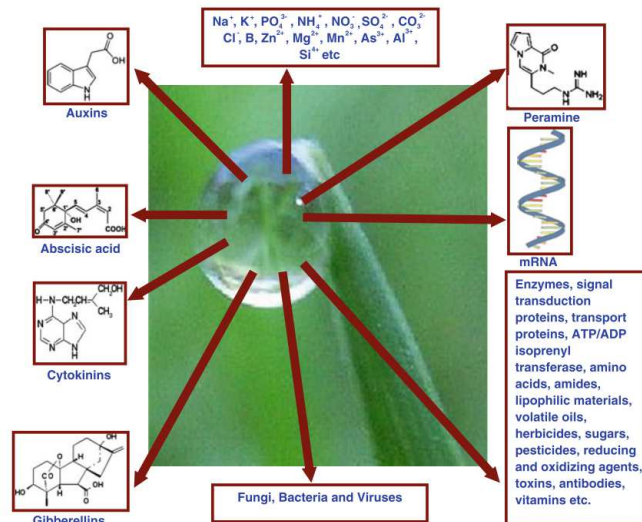


Figure 1.9 : Les gouttes de guttation contiennent des composés organiques et inorganiques comprenant des métabolites, des enzymes, des hormones, des vitamines, des sels, des ions et des nutriments (d'après Singh et Singh, 2013).

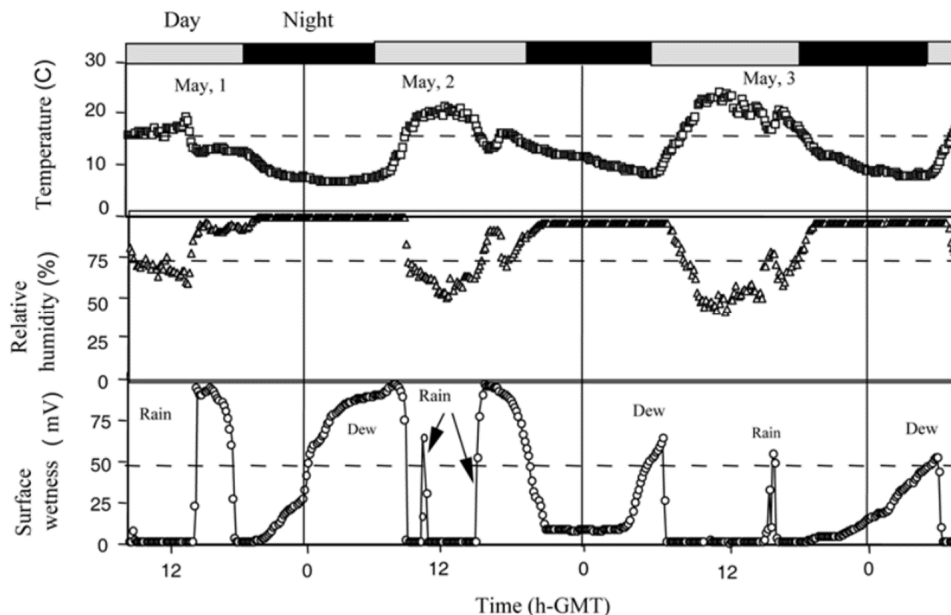


Figure 1.10 : Variation de la température, de l'humidité relative et de l'humidité à la surface des feuilles de poirier en fonction du temps. Les mesures ont été réalisées toutes les 10 minutes pendant trois jours (d'après Montesinos *et al.*, 2002).

(Dinant *et al.*, 2010; S. H. Taylor *et al.*, 2012; López-Portillo *et al.*, 2014). La sève élaborée est un environnement riche en nutriments. La pression osmotique y est donc, en général, trop élevée pour les bactéries. Cependant, les mollicutes des genres *Spiroplasma* et *Phytoplasma* vivent dans le phloème (Bové *et al.*, 2003; Danhorn et Fuqua, 2007). Les bactéries, lorsqu'elles sont vasculaires colonisent les vaisseaux du xylème (figure 1.7) (Koutsoudis *et al.*, 2006; Danhorn et Fuqua, 2007).

Les hydathodes (figure 1.8) constituent des prolongements des vaisseaux du xylème et forment des sites d'entrée préférentiels pour les bactéries (Beattie et Lindow, 1999). C'est, par exemple, le cas pour *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Staub et Williams, 1972; Bretschneider *et al.*, 1989; Hugouvieux *et al.*, 1998). Les hydathodes sont situés en marge des feuilles dans la région convergente entre la face adaxiale et la face abaxiale de la feuille. Une feuille mature d'*Arabidopsis thaliana* Col-0 comporte de deux à 16 hydathodes répartis sur toute la marge de la feuille (Wang *et al.*, 2011). En condition de transpiration faible et lorsque l'humidité du sol est élevée, la pression racinaire élevée conduit à la sécrétion de gouttes de sève par les hydathodes. C'est le phénomène de guttation (Chen et Chen, 2005, 2006, 2007; Singh et Singh, 2013). Les gouttes de guttation sont composées de composants organiques et inorganiques dont des métabolites, des enzymes, des hormones, des vitamines, des sels, des ions et des nutriments (figure 1.9) (Singh et Singh, 2013). Lorsque l'humidité relative diminue, les gouttes de guttation sont réabsorbées par les hydathodes, les composés complexes absorbés peuvent être transférés du xylème au phloème par les cellules de transfert (Pate et Gunning, 1972; Nagai *et al.*, 2013). Lorsque les gouttes de guttation sont réabsorbées, les bactéries présentes en surface des feuilles et situées dans les gouttes de guttation sont, par la même occasion, réabsorbées par les hydathodes (Ryan *et al.*, 2011).

1.3. Caractéristiques environnementales de la phyllosphère

1.3.1. Facteurs physiques, environnementaux et survie des bactéries

Les microorganismes qui vivent à la surface des feuilles subissent un environnement très variable (figure 1.10 et tableau 1.II) (Turner *et al.*, 2013). La fitness, la réponse chimiotactique, l'adhésion (...) des bactéries de la phyllosphère sont directement affectés par les paramètres environnementaux de la phyllosphère. Les conditions de température, de rayonnement UV,

Tableau 1.II : Survie de la souche T5.1 de *Clavibacter michiganensis* sur des feuilles d'arachide irradiées par différentes doses d'UV-C (d'après Jacobs et Sundin, 2001).

Strain	Time p.i. (h) ^a	UV-C dose (J m ⁻²)	% Survival ^b	In planta/in vitro survival ratio ^c
T5.1	0	50	49.1	0.9
		100	20.5	2.0
		150	11.5	15.7
		200	8.5	202.4
		250	2.7	540.0
	24	50	41.1	0.8
		100	20.1	2.0
		150	12.3	16.8
		200	8.2	195.2
		250	15.7	3,140.0
	48	50	43.9	0.8
		100	31.1	3.0
		150	11.2	15.3
		200	8.4	200.0
		250	11.1	2,220.0
	72	50	100.0	1.9
		100	41.1	4.0
		150	47.6	64.9
		200	27.9	664.3
		250	13.6	2,720.0
	96	50	67.8	1.3
		100	21.6	2.1
		150	19.0	25.9
		200	8.9	211.9
		250	1.5	300.0

(a) (p.i., post-inoculation). Après l'inoculation des bactéries par pulvérisation, les plantes ont été incubées dans une chambre de culture en condition d'humidité relative élevée.

(b) (Moyenne de la taille de population totale provenant des feuilles irradiées sur la moyenne des populations totales provenant des feuilles non-irradiées) × 100. Les populations bactériennes ont été récupérées par sonification et énumérées après des étalements et des dilutions.

(c) Ratios calculés à partir du pourcentage de survivants déterminés *in planta* sur le pourcentage de survivants déterminés *in vitro* à la même dose de UV-C.

d'humidité relative et d'humidité des feuilles sont effectivement très variables (Hirano et Upper, 2000; Montesinos *et al.*, 2002; Lindow et Brandl, 2003; Whipps *et al.*, 2008; Redford *et al.*, 2010; Rastogi *et al.*, 2013). Par exemple, les rayonnements UV, notamment ceux de petites longueurs d'onde UV-B (de 290 à 320 nm) causent des dommages sur l'ADN et d'autres fonctions de la cellule bactérienne ce qui fait diminuer la taille des populations microbiennes (Gunasekera et Paul, 2007). *Xanthomonas* sp. est plus sensible aux UV-B que *Corynebacterium aquaticum* (Gunasekera et Paul, 2007). Plus la dose d'UV-C est grande, plus la survie de *Clavibacter michiganensis* est altérée (Jacobs et Sundin, 2001). Les microorganismes vivant dans la phyllosphère doivent être résistants à ces stress abiotiques. C'est très souvent le cas des bactéries pigmentées qui sont rarement localisées dans la rhizosphère mais prédominent à la surface foliaire (Andrews, 1992). Les pigments sont généralement à l'origine d'une meilleure résistance aux rayonnements UV (Sundin et Jacobs, 1999; Jacobs et Sundin, 2001; Lindow et Brandl, 2003). Pour résister à ces stress environnementaux, les cellules bactériennes de la phyllosphère peuvent aussi former des micro-colonies et s'agréger en biofilm (Morris *et al.*, 1997, 1998; Jacques *et al.*, 2005). Un biofilm est défini comme un ensemble de bactéries adhérant ensemble et/ou à une surface et/ou à une interface contenu dans une matrice d'exopolymères (Costerton et Lewandowski, 1995; Flemming et Wingender, 2010) (pour plus de détails, voir le paragraphe 3.4). La disponibilité en eau à la surface des feuilles est un facteur limitant le développement des microorganismes (Boyer, 1968; O'toole et Cruz, 1980; Burkhardt *et al.*, 1999; Beattie, 2011; Fernández *et al.*, 2014). Par exemple, la disponibilité en eau à la surface des feuilles diminue avec la maturité des feuilles et passe de -2,5 MPa à -3 MPa respectivement pour des jeunes feuilles et feuilles matures de chêne vert (Fernández *et al.*, 2014). La dessiccation peut être la cause d'une augmentation de la concentration en solutés au niveau de la phyllosphère, ce qui a pour conséquence une augmentation de la pression osmotique à la surface foliaire. Si les bactéries de la phyllosphère ne sont pas résistantes à cette augmentation de la pression osmotique, cela est dommageable à leur l'intégrité cellulaire (Beattie et Lindow, 1995). La pluie peut aussi contribuer négativement à la colonisation de la phyllosphère en lessivant les parties aériennes des plantes infectées (Kinkel, 1997). Pendant et après les pluies, la taille et la composition des populations bactériennes varie (Jackson *et al.*, 2006). Il a, par exemple, été montré pour *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, que les fortes chutes de pluie lessivent et réduisent la taille de la population épiphyte de cette bactérie lorsqu'elle n'est pas installée comme dans le cas d'une situation non-hôte. A l'inverse, les pluies stimulent la croissance des populations de *P. syringae* pv. *tomato* sur tomate (Pietrarelli *et al.*, 2006). La pluie est donc aussi un facteur de dissémination des bactéries (Fitt *et al.*, 1989;

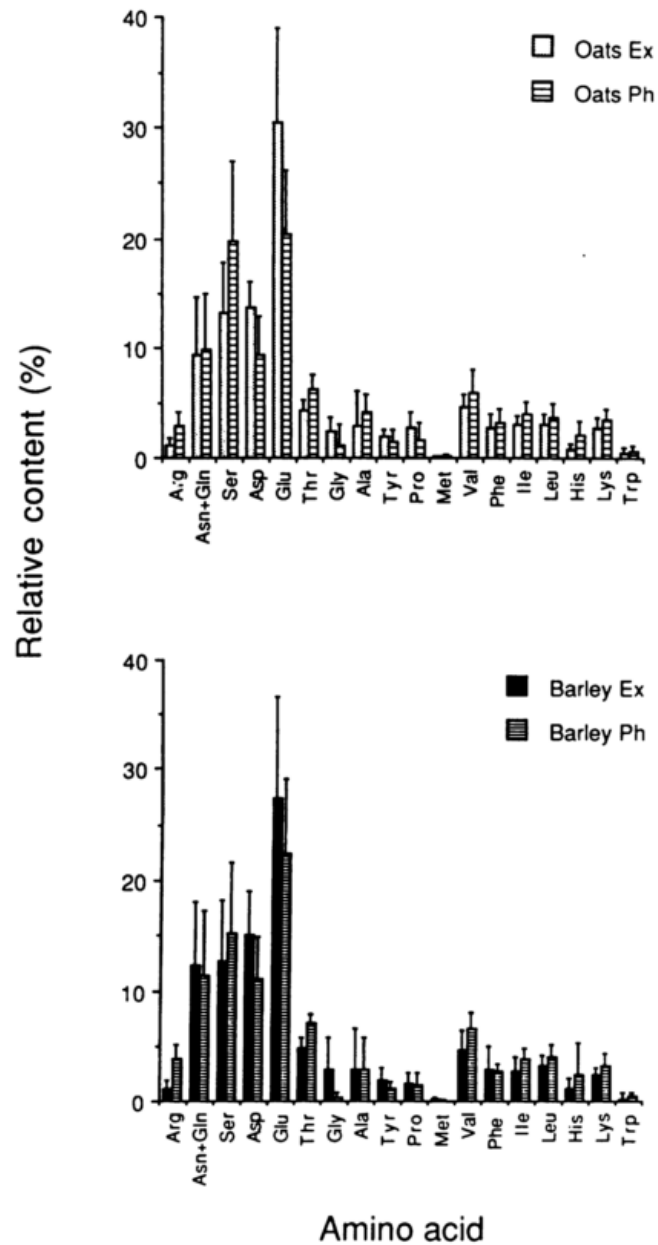


Figure 1.11 : Contenu relatif (%) des différents acides aminés dans les exsudats (Ex) et la sève élaboré du phloème (Ph) de l’avoine (Oats) et de l’orge (Barley). Les barres d’erreurs représentent l’erreur standard de la moyenne (d’après Weibull 1990).

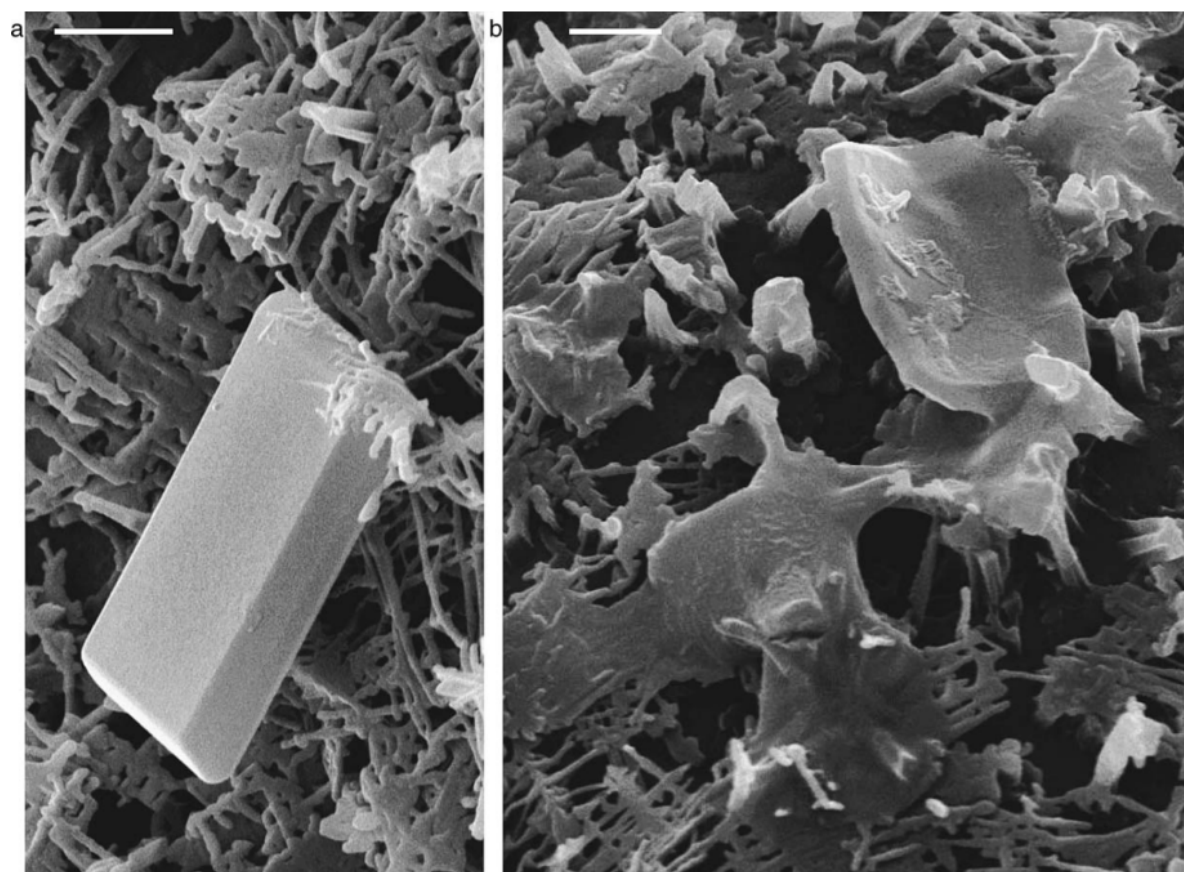


Figure 1.12 : Photographie en microscopie électronique à balayage de feuilles de *Brassica oleracea* après avoir précédemment pulvérisées des particules de (a) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et (b) NH_4HSO_4 . Echelle : $1\ \mu\text{m}$ (d'après Burkhardt, 2010).

Tableau 1.III : Classes majeures de lipides épicuticulaires de plantes (d'après Eigenbrode, 1995).

Lipid class	Chemical structure	Chain length range	Comment	Crystal morphology
<i>n</i> -Alkanes	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$	$\text{C}_{21}\text{--}\text{C}_{39}$	Common component; odd chain lengths dominate	Amorphous
Wax esters	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$	$\text{C}_{32}\text{--}\text{C}_{64}$	Major component in wax of many plants	Plates or needles
Aldehydes	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CHO}$	$\text{C}_{26}\text{--}\text{C}_{32}$	Usually minor component; even chain lengths	Granules or ribbons
Ketones	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$	$\text{C}_{25}\text{--}\text{C}_{35}$	Major component in some plants (e.g. <i>Brassica</i>)	Spiky plates
Secondary alcohols	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CHOH}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$	$\text{C}_{15}\text{--}\text{C}_{35}$	Major component in wax of some plants	Plates or tubes
β -Diketones	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COCH}_2\text{CO}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$	$\text{C}_{27}\text{--}\text{C}_{33}$	Dominant in wax of some Gramineae	Tubes
Fatty alcohols	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$	$\text{C}_{14}\text{--}\text{C}_{36}$	Often dominant component; even chain lengths	Plates
Fatty acids	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$	$\text{C}_{10}\text{--}\text{C}_{40}$	Common, sometimes dominant; even chain lengths	Unknown
Triterpenoids	$\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ (with ursane or olean ring skeleton)		Sometimes major components; α -amyirin and β -amyirin, ursolic acid, oleanolic acid, and related compounds	Unknown

Tableau 1.IV : Rendement en huiles essentielles et concentration des composés phénoliques extraits des surfaces foliaires de 19 espèces végétales (d'après Karamanoli *et al.*, 2005). (1) Aucune huile essentielle et aucun composé phénolique n'a été détecté dans les autres plantes testées : oignon, chou-fleur, laitue, poireau, pomme de terre, céleri, chou et aneth. (2) poids sec. (3) poids frais. Les valeurs signifient : moyenne \pm écart type.

Espèces végétales ¹	Huile essentielle (ml/100g de ps) ²	Composés phénoliques (μ g/g de pf) ³
Cèdre	0,2 \pm 0,04	-
Oranger	0,4 \pm 0,1	18,6 \pm 3,1
Lavande	0,8 \pm 0,2	23,4 \pm 1,2
Laurier	1,2 \pm 0,1	23,8 \pm 2,1
Tabac	-	25,3 \pm 1,7
Ail	-	33,0 \pm 5,8
Olivier	-	36,6 \pm 2,7
Eucalyptus	1,3 \pm 0,1	52,6 \pm 2,9
Origan	2,9 \pm 0,3	370 \pm 3,1
Romarin	1,9 \pm 0,3	487 \pm 3,6
Sauge	2,0 \pm 0,2	545 \pm 3,8

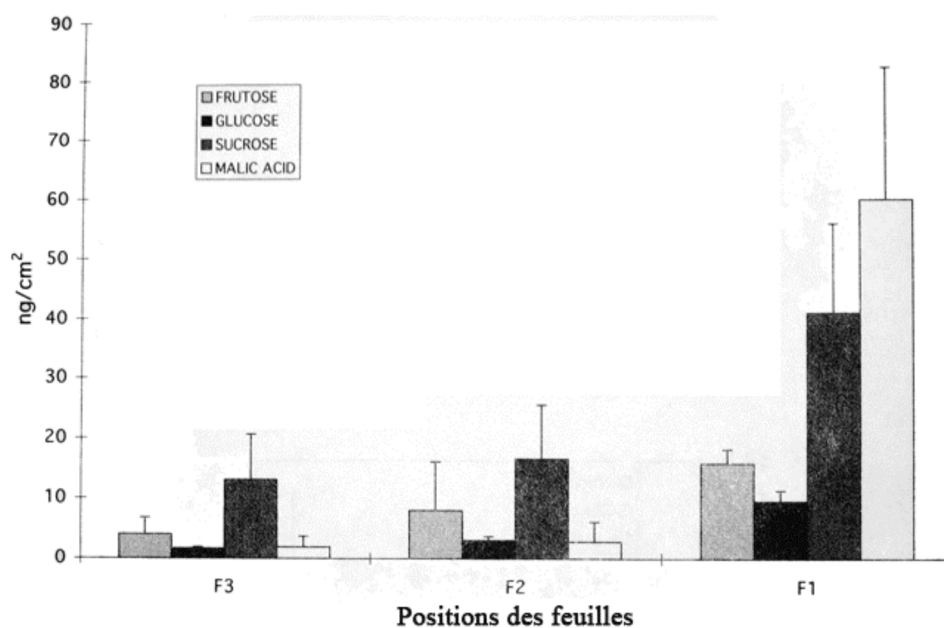


Figure 1.13 : Variations des quantités de fructose, glucose, saccharose et d'acide malique collectées à la surface inférieure des feuilles de *Nicotiana plumbaginifolia*, en fonction de l'âge et de la position des feuilles. Les feuilles sont divisées en trois groupes de trois feuilles (F1, F2 et F3) avec F1 correspondant aux feuilles les plus âgées (d'après Derridj, 1996).

Constantinidou *et al.*, 1990; Hirano *et al.*, 1996; Jacques *et al.*, 2005). La pluie, les vents violents, le gel sont autant de facteurs qui favorisent les blessures et entraînent le relargage de produits nutritifs favorisant la pénétration des bactéries dans les tissus (Hirano *et al.*, 1996).

1.3.2. Disponibilité en nutriments dans la phyllosphère

La colonisation de la surface foliaire par les bactéries épiphytes est fonction de la disponibilité en nutriments, de la quantité et de la diversité des exsudats foliaires. Contrairement à la rhizosphère et aux vaisseaux du phloème, où de grandes quantités de nutriments sont accessibles aux bactéries, la surface foliaire et l'apoplasme en sont pauvres (Lindow et Brandl, 2003; Vorholt, 2012). Au niveau de la surface foliaire, les sources de carbone majoritaires, mais présentes en très faibles quantités, sont des sucres simples comme le saccharose, le glucose et le fructose (Tukey, 1970; Fiala *et al.*, 1990; Weibull *et al.*, 1990; Lindow et Brandl, 2003; Whipps *et al.*, 2008). La disponibilité et la composition en nutriments comme les acides organiques, les acides aminés (figure 1.11), les carbohydrates ou les minéraux (figure 1.12) varient en fonction de l'espèce végétale (tableau 1.III et 1.IV), de l'organe, de l'âge et de l'état physiologique de la feuille (figure 1.13) et de la présence ou non de tissus endommagés (Blakeman, 1972; Fiala *et al.*, 1990; Derridj, 1996; Karamanoli *et al.*, 2005; Burkhardt, 2010). Chez *Nicotiana plumbaginifolia*, la concentration de fructose, glucose, saccharose et acide malique est au moins deux fois supérieure à la surface des vieilles feuilles qu'à celle des jeunes feuilles (Derridj, 1996). Bien que les nutriments retrouvés en surface foliaire proviennent de l'intérieur de la feuille (diffusion à travers la cuticule, transpiration, exsudats, gouttes de guttation...), il est possible de trouver d'autres types de nutriments provenant de l'extérieur. Par exemple, lorsque des pucerons colonisent la feuille, ils puisent leurs nutriments dans les cellules criblées des vaisseaux du phloème (sève élaborée) et sécrètent du miellat à la surface des feuilles. Le miellat est très riche en nutriments variés (sucres, acides aminés et protéines, Woodring *et al.*, 2004; Dinant *et al.*, 2010; Leroy *et al.*, 2011; S. H. Taylor *et al.*, 2012; Sabri *et al.*, 2013). Le pollen, les débris cellulaires et le miellat contribuent positivement à la colonisation des bactéries épiphytes (Mercier et Lindow, 2000; Stadler et Müller, 2000). Des métabolites secondaires comme des alcaloïdes, glucosinolates, terpènes (huiles essentielles) (tableau 1.IV), acides phénoliques (flavone, quercétine et naringénine) et protéines de défense (défensines, lipases et chitinases...) peuvent aussi être présents à la surface des feuilles et à proximité des blessures (Kubo *et al.*, 1995; Rauha *et al.*, 2000; Ancillo *et al.*, 2003; Karamanoli *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2005; Silverstein *et al.*, 2005; Yadav *et al.*, 2005; Ruppel *et al.*, 2008;

Tableau 1.V : Quantités de sucre en surface des feuilles avant et après colonisation bactérienne et capacité de diverses plantes à supporter la croissance bactérienne. (a) « Bacterial carrying capacity » est défini comme la taille de population bactérienne la plus grande atteinte après 2 jours d’incubation en condition d’humidité saturée et après une inoculation de *P. fluorescens* A506 à une concentration égale à 10^6 UFC/mL. (b) Erreur standard de la moyenne (d’après Mercier et Lindow, 2000).

Plant species	Bacterial carrying capacity (log CFU/g) ^a	Total sugars (µg/g)	
		Before colonization	After colonization
Bean	7.19 ± 0.04^b	1.08 ± 0.22	0.31 ± 0.06
Corn	6.29 ± 0.13	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.02
Cucumber	7.04 ± 0.04	1.38 ± 0.22	1.46 ± 0.19
Pea	5.81 ± 0.12	0.06 ± 0.02	0.14 ± 0.03
Tomato	7.48 ± 0.03	1.55 ± 0.38	0.40 ± 0.05

Savchenko *et al.*, 2014). La colonisation et la croissance bactérienne de la surface des feuilles fait diminuer la disponibilité en nutriments (tableau 1.V) (Mercier et Lindow, 2000). Sur les feuilles colonisées, il existe une quantité résiduelle de nutriments qui ne sont pas physiquement accessibles pour les bactéries. Ceci est dû à la faible disponibilité en eau et/ou à la diffusion des nutriments à travers la surface foliaire (Mercier et Lindow, 2000). Aussi, du fait de la faible quantité en nutriments à la surface des feuilles, les bactéries qui se développent en surface n'atteignent pas des tailles de population élevées contrairement à celles qui peuvent pénétrer et se développer à l'intérieur des tissus en utilisant les ressources internes sans que la plante ne se défende (Darsonval *et al.*, 2008).

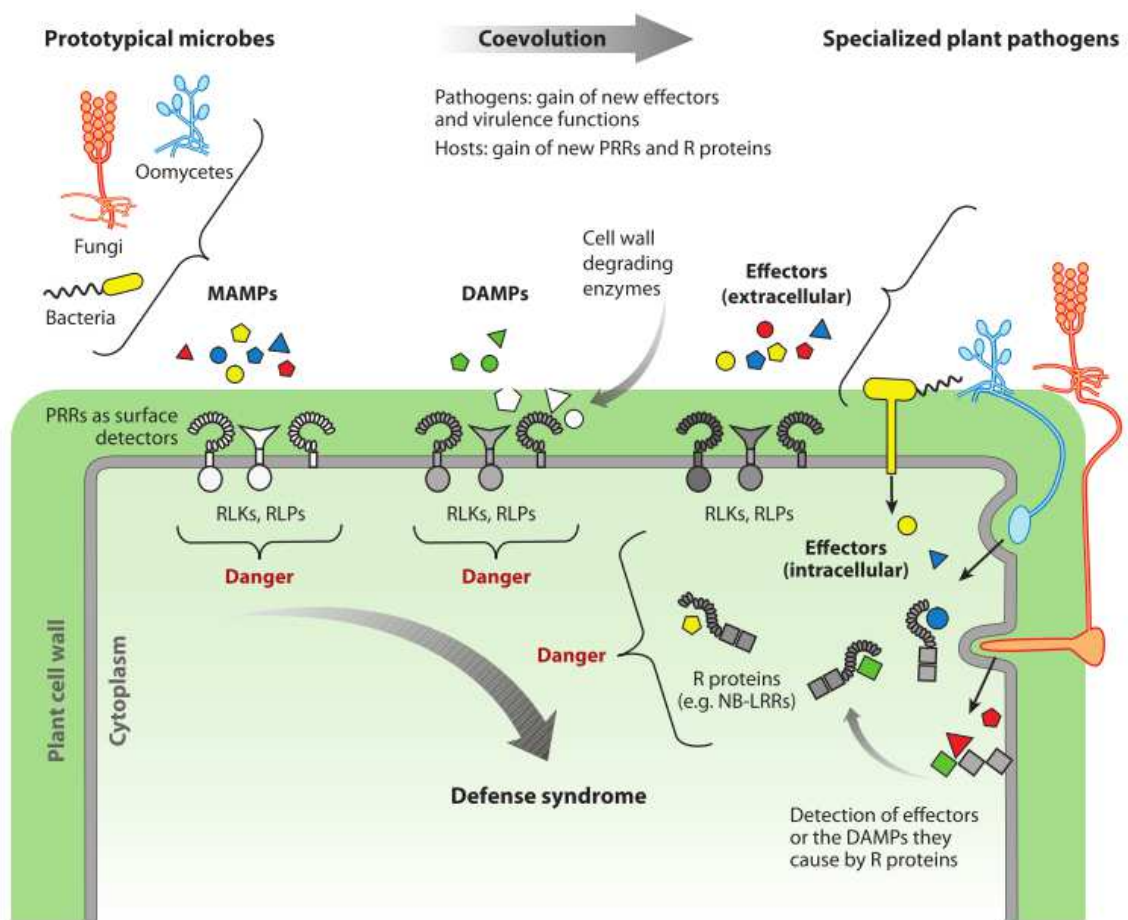


Figure 1.14 : Les MAMP (microbe-associated molecular patterns), les DAMP (damage-associated molecular patterns) et les effecteurs sont perçus par la plante comme des signaux de danger, l'alertant de la présence d'un pathogène. En réponse à cette détection, la plante met en place des défenses vis à vis du pathogène (d'après Boller et Felix, 2009).

2. Types d'interactions plantes/bactéries et défense des plantes

Trois types d'interaction plantes/bactéries ont été décrits. Ce sont l'incompatibilité de base ou résistance non-hôte, la compatibilité de base et l'incompatibilité spécifique.

2.1. Interaction non-hôte, incompatibilité de base ou résistance non-hôte

Grâce à des mécanismes naturels de défense, les plantes sont résistantes à la plupart des bioagresseurs qu'elles rencontrent (Thordal-Christensen, 2003; Alfano et Collmer, 2004). En premier lieu, la cuticule et la paroi cellulaire forment des barrières physiques, constitutives, qui s'opposent à la pénétration de la plupart des microorganismes. Au niveau de la surface des feuilles, la cuticule freine la pénétration de l'agent pathogène puisque pour pénétrer dans la plante, l'agent pathogène doit posséder des cutinases pour dégrader la cutine de la cuticule. Si certains agents pathogènes parviennent à franchir ces premières lignes de défense, l'issue de la confrontation entre cet «intrus» et la plante dépend de la capacité qu'a la plante à percevoir ce dernier, puis à déclencher des réactions de défense propres à empêcher le développement de la maladie. Il peut, dans ce cas, y avoir une réponse hypersensible (HR) (Heath, 2000). Au niveau macroscopique, la HR est caractérisée par des lésions sèches clairement délimitées qui bloquent la progression de l'agent pathogène. Ces lésions correspondent à l'induction rapide d'une mort cellulaire localisée autour du point d'infection. La reconnaissance se fait grâce à certains composés, appelés éliciteurs. Ces éliciteurs sont des molécules capables d'induire des réactions de défense des plantes. Ils peuvent être exogènes ou endogènes. Lorsqu'ils sont exogènes (apportés par le microorganisme lui-même), ce sont des MAMP (Microbe-Associated Molecular Patterns) ou anciennement appelés PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) ; et lorsqu'ils sont endogènes (apportés par la plante), ce sont des DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns) (figure 1.14) (Heil, 2009). L'exemple le plus connu de MAMP est le peptide *flg22* de certaines flagellines bactériennes, reconnu par le récepteur FLS2 (FLAGELLIN SENSING2) (Zipfel *et al.*, 2004; Chinchilla *et al.*, 2006; Altenbach et Robatzek, 2007; Naito *et al.*, 2007; Luna *et al.*, 2011). Les plantes sont capables de reconnaître

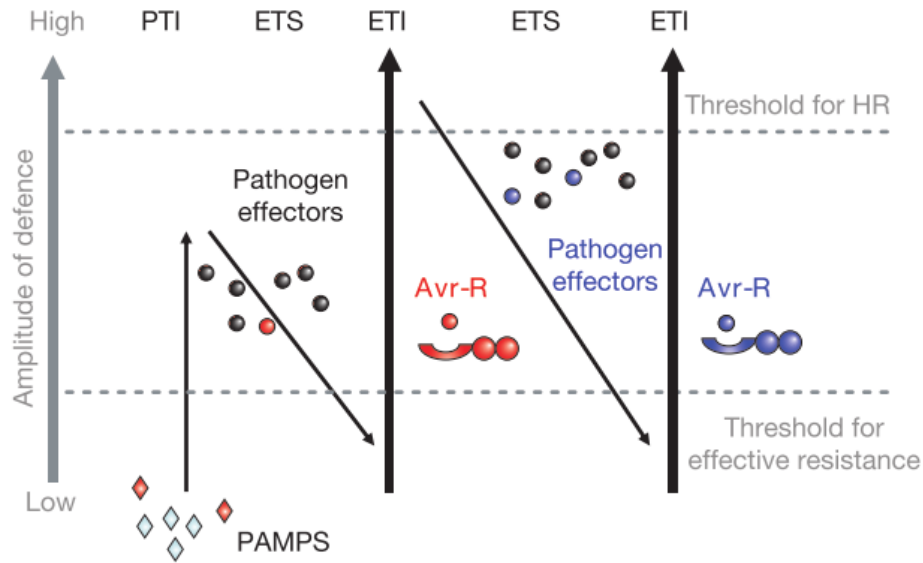


Figure 1.15 : Modèle en zigzag illustrant la course à l'armement entre la plante et l'agent pathogène, et la résistance ou la sensibilité de la plante face à ce pathogène. Dans la phase 1, la plante détecte une molécule du pathogène Pathogen-associated molecular patterns (PAMP) et déclenche une défense basale de type PAMP-triggered immunity (PTI). Dans la phase 2, les agents pathogènes sécrètent des effecteurs qui interfèrent avec la PTI. Il y a expression de la maladie effector-triggered susceptibility (ETS). Dans la phase 3, un effecteur (indiqué en rouge) est reconnu par une protéine de résistance R de la plante, induisant une effector-triggered immunity (ETI). L'ETI est une version amplifiée du PTI qui dépasse souvent le seuil pour induire une réaction hypersensible (HR). Dans la phase 4, les pathogènes, qui ont perdu l'effecteur rouge et qui en ont peut-être gagné d'autres pouvant supprimer l'ETI, peuvent provoquer de nouveau la maladie. C'est de nouveau l'ETS. La sélection favorise les nouveaux allèles de résistance des plantes qui reconnaissent un effecteur modifié ou un nouvel effecteur. C'est de nouveau l'ETI (d'après Jones et Dangl, 2006).

spécifiquement ces molécules microbiennes *via* des récepteurs du type NB-LRR (Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat) (Enkhbayar *et al.*, 2004; Altenbach et Robatzek, 2007). La fixation d'un éliciteur sur un récepteur de la cellule végétale déclenche une cascade d'évènements qui aboutit à la biosynthèse de composés de défense. C'est l'élicitation des réactions de défenses basales de type MTI ou PTI (MAMP- ou PAMP-Triggered Immunity) (Newman *et al.*, 2013).

2.2. Interaction hôte, compatibilité de base (maladie)

L'interaction compatible est une situation pendant laquelle, l'agent pathogène est capable de contourner les réactions de défenses de la plante pour provoquer la maladie. Un agent pathogène est capable de provoquer la maladie sur une ou plusieurs espèce(s) végétale(s). Ces différentes plantes représentent la gamme d'hôte de cet agent pathogène. Dans la « course à l'armement » entre la plante et la bactérie, certaines bactéries ont acquis des gènes codant des facteurs du pouvoir pathogène (Boller et Felix, 2009; Lukasik et Takken, 2009; Dodds et Rathjen, 2010). Ces facteurs sont dans certains cas, capables de contourner les défenses basales de la plante. C'est souvent le cas des effecteurs de type III (ET3) présents chez de nombreuses bactéries phytopathogènes (Mudgett, 2005; Kim *et al.*, 2009, 2013; K. W. Taylor *et al.*, 2012).

2.3. Interaction hôte, incompatibilité spécifique ou résistance hôte

La résistance des génotypes de plantes hôtes face à un agent pathogène, peut passer par la reconnaissance spécifique par un récepteur R d'effecteurs bactériens appelés protéines d'avirulence ou protéines Avr. Cette résistance est qualitative et est dite « gène pour gène » ou R/Avr (Flor, 1971). Plus la plante reconnaît rapidement l'agent pathogène et plus l'induction des défenses est rapide, plus la résistance de la plante en question face à cet agent pathogène est grande. La reconnaissance R/Avr conduit à une HR (Heath, 2000). Ce type d'interaction sélectionne les plantes et les agents pathogènes qui sont de plus en plus armés avec respectivement des protéines de résistance R ou des protéines d'avirulence Avr. Cette course à l'armement a été expliqué par le concept de modèle en zig-zag (figure 1.15) (Jones et Dangl,

2006; Ma *et al.*, 2006; Ma et Guttman, 2008; Stuart *et al.*, 2013). Ce modèle met en évidence la coévolution entre les agents pathogènes et leurs plantes hôtes. En effet, lorsque la plante détecte un PAMP, elle déclenche un mécanisme complexe de défenses de type PTI (Zhang *et al.*, 2010; Thomma *et al.*, 2011). Une acquisition ou évolution d'un ET3 conduit à la maladie (ETS, Effector-Trigged Susceptibility). Face à l'évolution des ET3, la plante évolue et acquiert de nouveaux gènes de résistance R. Dans ce cas, le nouvel ET3 est reconnu par la plante qui va déclencher une HR de plus forte intensité appelée ETI (Effector-Trigged Immunity). Par la suite, une évolution du répertoire des ET3 chez les bactéries permettra de contourner les défenses de la plante jusqu'à ce que celle-ci acquière à son tour de nouveaux gènes de résistance. Le « gagnant » de l'interaction est donc successivement la plante puis la bactérie, et ainsi de suite (Jones et Dangl, 2006).

2.4. Défenses mises en place par les plantes

Au cours de leur vie, les plantes peuvent être soumises à de nombreux facteurs pouvant gêner leur bon développement. Tout d'abord, les plantes peuvent avoir à faire face à différents stress abiotiques dont les variations de températures parfois extrêmes et sur une courte période (du chaud au froid ou inversement), la salinité élevée, la sécheresse, l'anoxie ou l'hypoxie, les stress aux métaux lourds et des carences nutritionnelles. Les plantes peuvent également subir des attaques de différents bioagresseurs tels que les insectes, les nématodes, les herbivores, les champignons, les bactéries ou les virus. Contrairement à la plupart des animaux, elles n'ont pas la possibilité de se déplacer pour échapper à ces stress biotiques et abiotiques. Pour survivre, elles doivent donc mettre en place des défenses afin de faire face à la majorité des stress qu'elles sont susceptibles de rencontrer.

Lorsque les cellules végétales sont attaquées par un agent pathogène, elles peuvent envoyer des signaux chimiques aux autres cellules saines ou à la plante entière. L'induction des défenses devient alors systémique et protège la plante d'infections ultérieures. Trois phytohormones principales semblent intervenir dans la transmission de ce signal et le contrôle des défenses des plantes. Ce sont l'acide salicylique (SA, Salicylic Acid), l'acide jasmonique (JA, Jasmonic Acid) et l'éthylène (ET) régulant respectivement les voies de signalisation dites du SA (Pieterse et van Loon, 1999), du JA (Mueller *et al.*, 1993) et de l'ET (Alonso et Stepanova, 2004). Les différentes voies de signalisation agissent indépendamment, en synergie ou de manière

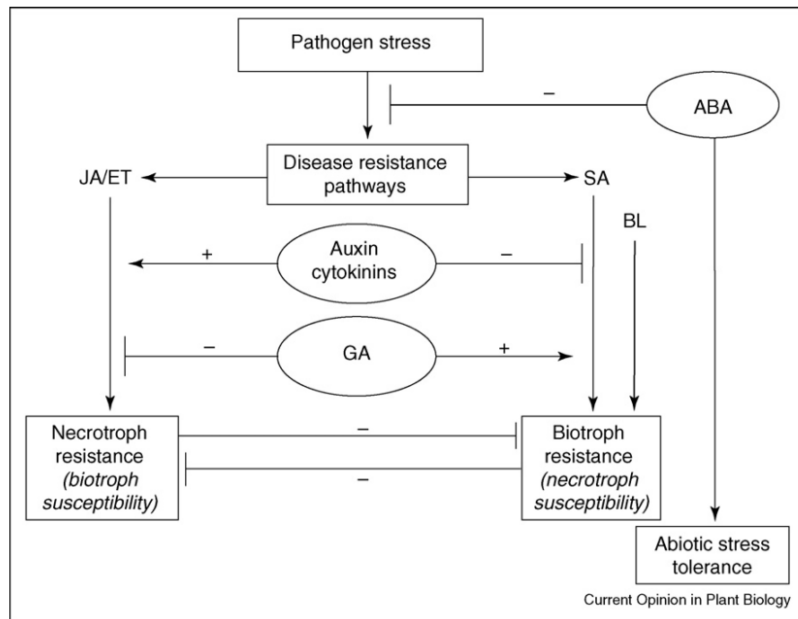


Figure 1.16 : Modèle indiquant les interactions probables entre les différentes voies de signalisation pendant une interaction plante/pathogène. ABA (Abscissic Acid); JA (Jasmonic Acid) ; ET (Ethylene) ; SA (Salicylic Acid) ; GA Gibberellic Acid) ; BL : brassinolides (d'après Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007).

antagoniste (figure 1.16) (Feys et Parker, 2000; Kunkel et Brooks, 2002; Pieterse *et al.*, 2009; Kliebenstein, 2014; Wei *et al.*, 2014). Ces hormones régulent chacune des gènes spécifiques de défense et en co-régulent d'autres (Salzman *et al.*, 2005). De nombreuses voies de défense des plantes peuvent être mises en place (Dixon, 2001; Dudareva *et al.*, 2013). Les défenses passent par la modification de la paroi cellulaire (pectine, lignine) et dépôts de callose ralentissant la progression de l'agent pathogène (Kudlicka et Brown, 1997; Raven *et al.*, 2007; Luna *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2014), le stress oxydatif (ROS : radical superoxyde O_2^- , radical hydroxyl OH^\cdot , peroxyde d'hydrogène H_2O_2) (Baxter *et al.*, 2014), la production de protéines PR (Pathogenesis-related Protein) (Pieterse et van Loon, 1999) (PR2, glucanase) et les voies des phénylpropanoïdes (flavonoïdes, dihydrochalcones, polyphénols) (Gang *et al.*, 2001; Dugé de Bernonville *et al.*, 2010, 2011; Naoumkina *et al.*, 2010), des isoprénoïdes (mono et polyterpènes, sesquiterpènes...) (Kirby et Keasling, 2009; Jirschitzka *et al.*, 2013) et des cystéines sulfoxides (oxydes de propanthial, polysulfides) (Hansen *et al.*, 1997).

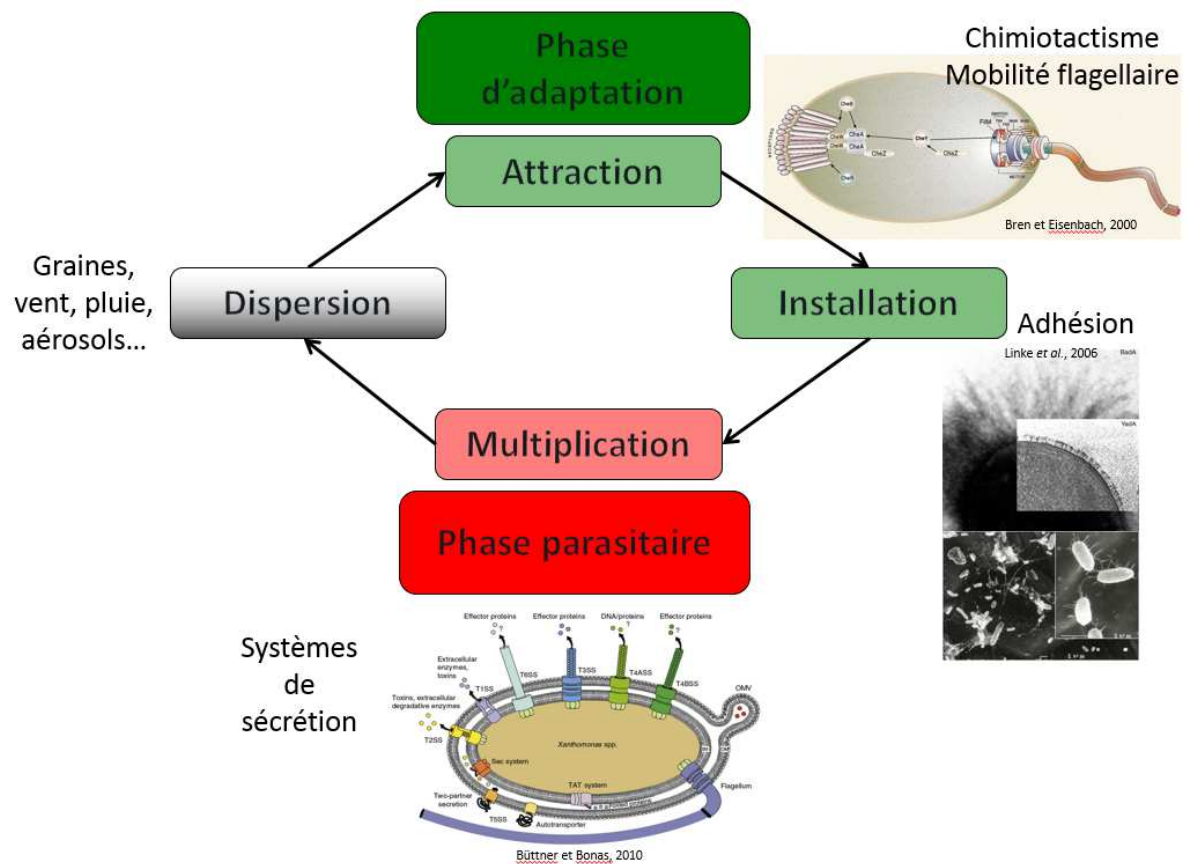


Figure 1.17 : Cycle biologique d'une bactérie du genre *Xanthomonas* sur une plante hôte (d'après Jacques, 2014, comm. pers. ; Bren et Eisenbach, 2000 ; Linke *et al.*, 2006, Büttner et Bonas, 2010).

3. Perception, adaptation des bactéries à l'hôte et déterminants du pouvoir pathogène

D'une manière générale, le cycle biologique d'une bactérie sur son hôte se compose de quatre étapes : attraction, installation, multiplication et dispersion (figure 1.17). Les étapes d'attraction et d'installation constituent la phase d'adaptation à l'hôte. Le chimiotactisme et la mobilité flagellaire permettent l'étape d'attraction. La réussite de cette phase d'adaptation conditionne la phase parasitaire dépendante de différents systèmes de sécrétion et en particulier du système de sécrétion de type III (SST3). Le cycle se termine par une étape de dispersion *via* les graines, vent, éclaboussures d'eau, aérosols contaminants... Un nouveau cycle pourra redémarrer à partir de ces sources d'inoculum.

3.1. Le tactisme chez les bactéries

Pour survivre et se développer dans un environnement dont les conditions physico-chimiques varient constamment, les bactéries doivent continuellement adapter leur métabolisme (Vladimirov et Sourjik, 2009; Alexandre, 2010). Les nutriments tels que les acides aminés, les sucres et les acides organiques et d'autres facteurs tels que le dioxygène (accepteur final d'électron), la lumière ou la température sont métabolisables ou peuvent affecter le métabolisme. Tous ces facteurs physico-chimiques peuvent agir comme des signaux pour les bactéries (Alexandre, 2010). La détection de signaux spécifiques dépend de la présence de récepteurs dédiés, qui sont caractérisés par leur spécificité vis-à-vis du signal détecté et la sensibilité de la détection. Quelle que soit la nature des signaux détectés, tous les récepteurs se composent d'au moins une région senseur et d'une région de transduction/signalisation (Alexandre, 2010). Un des systèmes de transduction du signal le mieux caractérisé est le chimiotactisme. Le chimiotactisme est défini comme le mouvement dirigé de cellules mobiles dans des gradients de divers paramètres physico-chimiques (Alexandre, 2010). Que les signaux soient attractifs ou répulsifs, ils sont détectés par les Methyl-accepting Chemotaxis Proteins (MCP). Le chimiotactisme a pour fonction de réguler la probabilité de changement dans le sens de rotation du ou des moteur(s) flagellaire(s). Ce changement dans le sens de rotation affecte à son tour la façon dont les bactéries nagent dans leur environnement. La rotation du moteur

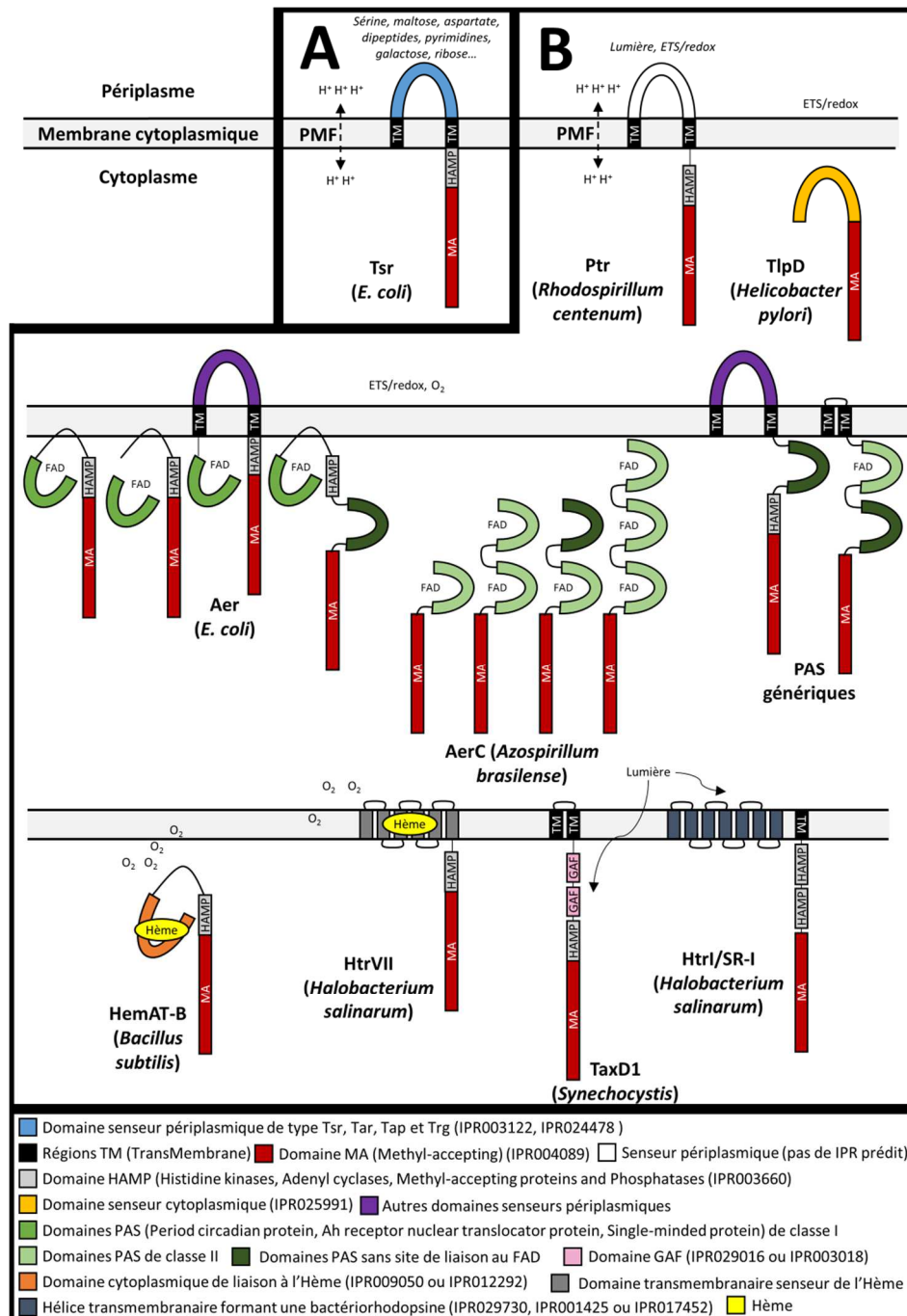


Figure 1.18 : Représentation schématique des structures et fonctions des MCP actuellement décrits chez les bactéries. Il existe deux types de MCP : (A) les chémorécepteurs et (B) les récepteurs tactiques pour l'énergie. Les chémorécepteurs sont caractérisés par un domaine sensor périplasmique capable de se lier directement à des molécules comme des acides aminés, des sucres, des acides nucléiques et des peptides. Les récepteurs tactiques pour l'énergie peuvent détecter des changements de niveau énergétique ou redox intracellulaire induits par la lumière, des accepteurs terminaux d'électron (O₂), des composés Redox actifs ou des substrats métabolisables (donneurs d'équivalents réducteurs). Les domaines PAS de classes I (Aer) et II (AerC) peuvent se lier de manière covalente au FAD tandis que les autres PAS ne se lient pas au FAD. Abréviations : PMF (Force Proton Motrice), ETS (Système de Transport d'électrons), FAD (Flavine adénine dinucléotide), PAS (Period circadian protein, Ah receptor nuclear translocator protein, Single-minded protein) (d'après Alexandre *et al.*, 2010 ; Schweinitzer *et al.*, 2010 ; Xie *et al.*, 2010).

flagellaire est possible grâce à un gradient électrochimique transmembranaire, la force motrice protonique (PMF : proton motive force). Les changements de sens de rotation du moteur flagellaire sont contrôlés par la voie de transduction du signal chimiotactique (Berg, 2003; Wadhams et Armitage, 2004; Alexandre, 2010).

3.1.1. Détection de signaux par les Methyl-Accepting Chemotaxis Proteins (MCP)

3.1.1.1. Domaines fonctionnels et rôle des MCP

Les MCP sont généralement composés de domaines MA (**M**ethyl-**A**ccepting) et HAMP (pour **H**istidine kinases, **A**denylyl cyclases, **M**ethyl-accepting chemotaxis proteins, and **P**hosphatases) cytoplasmiques, d'un ou plusieurs domaine(s) senseur(s) (cytoplasmique ou périplasmique). Ils peuvent aussi être composés d'une ou plusieurs région(s) transmembranaire(s) dont le rôle est d'ancrer les MCP dans la membrane cytoplasmique (figure 1.18).

Le **domaine MA** (figure 1.18) est le domaine de transduction/signalisation. Il est présent dans tous les types de MCP (Alexandre, 2010; Schweinitzer et Josenhans, 2010). Ce domaine est méthylé lorsqu'il est lié à une molécule de signalisation, ou déméthylé par les protéines CheR et CheB. Il interagit directement avec les protéines CheW et CheA dans le cytoplasme.

Le **domaine HAMP** (figure 1.18 et 1.19) permet de contrôler la méthylation du domaine MA et la phosphorylation de CheA. En présence d'un attractant, le domaine HAMP change de conformation et le domaine MA est déméthylé. Cela conduit à l'absence d'activité kinase de CheA (la protéine CheA est non phosphatée). Au contraire, lorsqu'un répulsif est détecté, le domaine HAMP change de conformation, le domaine MA est méthylé. Cela conduit à l'activité kinase de CheA (la protéine CheA est phosphatée) (Stewart, 2014). CheA-P va alors transférer son phosphate à CheY. La mutation du domaine HAMP entraîne l'activation de l'activité kinase de CheA induisant le mouvement désordonné (Watts *et al.*, 2011; Airola *et al.*, 2013; Stewart, 2014).

Le **domaine senseur** (figure 1.18) des MCP ou « Ligand-Binding Region » (LBR) leur permet de détecter un ou des signaux attractifs et/ou répulsifs. Il existe deux types de MCP : les chémorécepteurs et les récepteurs tactiques pour l'énergie (figure 1.18) (Alexandre, 2010; Schweinitzer et Josenhans, 2010). Les chémorécepteurs (figure 1.18A) sont caractérisés par un domaine senseur périplasmique généralement capable de détecter des gradients de

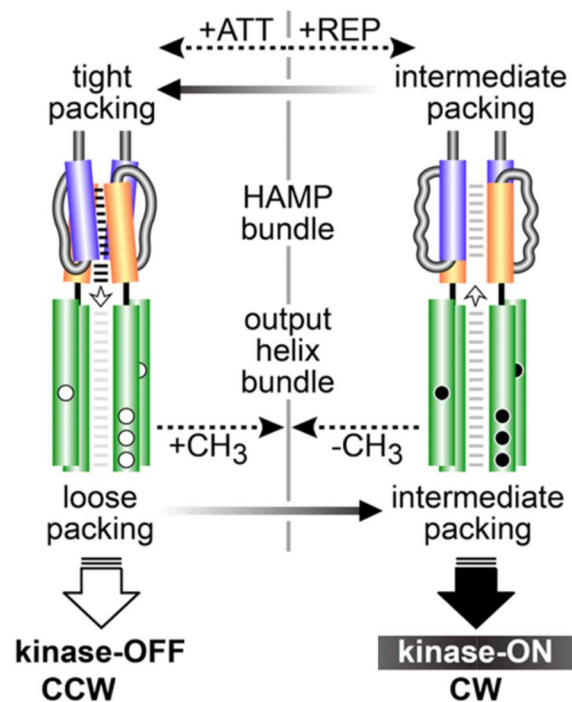


Figure 1.19 : Fonctionnement du domaine HAMP des MCP et conséquence sur le sens de rotation du flagelle. En présence d'un répulsif (REP), il y a changement de conformation du domaine HAMP et le domaine MA est méthylé. Cela conduit au fonctionnement de l'activité kinase et à la rotation horaire du flagelle (CW : clockwise). En présence d'un attractant (ATT), le domaine HAMP revient dans sa position initiale et le domaine MA est déméthylé. Cela conduit au non fonctionnement de l'activité kinase et à la rotation anti-horaire (CCW : counterclockwise) du flagelle (d'après Stewart, 2014).

concentrations de molécules comme des acides aminés, des sucres, des acides nucléiques et des peptides. Les récepteurs tactiques pour l'énergie peuvent aussi bien être périplasmiques que cytoplasmiques (figure 1.18B). Ils détectent des variations de niveau énergétique.

3.1.1.1.1. Les chémorécepteurs

Chez *E. coli*, quatre types de MCP dont le domaine senseur est périplasmique ont été décrits : Tsr, Tar, Tap et Trg. Ayant le même domaine InterPro IPR003122 (domaine TarH : **T**axis towards **A**spartate and **R**elated amino acids and **H**omologs), ces quatre MCP sont regroupés sous le nom de Tsr (figure 1.18A). La structure des domaines senseurs des Tsr est en « Four-Helix Bundle Methyl-accepting Chemotaxis Protein » (4HB_MCP, IPR024478) (Kim *et al.*, 1999; Ulrich et Zhulin, 2005). Ils détectent, *via* la force proton motrice (PMF), respectivement au moins la sérine, le maltose et l'aspartate, les dipeptides et les pyrimidines, le galactose et le ribose (Manson *et al.*, 1998; Hazelbauer *et al.*, 2008; Hazelbauer, 2012b). Tsr et Tar peuvent être sensibles aux changements de pH cytoplasmique, glycérol et température (Pham et Parkinson, 2011). Par exemple, une chute de pH induit une réponse attractive par Tar tandis qu'elle induit une répulsion par Tsr. Cette différence de réponse est due à quelques variations d'acides aminés du domaine HAMP entre ces deux types de récepteurs (Krikos *et al.*, 1985; Umemura *et al.*, 2002; Pham et Parkinson, 2011). Les domaines Cache, pour **C**a²⁺ channels and **chem**otaxis receptors, sont largement répandus chez les bactéries. Ce domaine détecte des petites molécules présentes dans le périplasma comme des acides aminés, des sucres et des acides organiques (Anantharaman et Aravind, 2000; Mougél et Zhulin, 2001; Zhulin *et al.*, 2003; Baraquet *et al.*, 2009; Dolphin, 2012; Sisti *et al.*, 2013).

3.1.1.1.2. Les récepteurs tactiques pour l'énergie

D'autres MCP sont des récepteurs tactiques pour l'énergie (figure 1.18B). Ces MCP sont capables de détecter des changements de niveau énergétique ou redox intracellulaire induits par la lumière, des accepteurs terminaux d'électron (O₂), des composés redox actifs ou des substrats métabolisables (donneurs d'équivalents réducteurs) (Manson *et al.*, 1998; Alexandre, 2010; Schweinitzer et Josenhans, 2010).

Les domaines PAS, pour **P**eriod circadian protein, **A**h receptor nuclear translocator protein, **S**ingle-minded protein (Ponting et Aravind, 1997; Zhulin *et al.*, 1997; Taylor et Zhulin, 1999; Möglich *et al.*, 2009), détectent des variations de la concentration en O₂, du potentiel redox et de la lumière (Taylor et Zhulin, 1999; Taylor, 2007), *via* l'hème (Key et Moffat, 2005), la flavine mononucléotide (FMN) (Möglich et Moffat, 2007), la flavine adénine dinucléotide

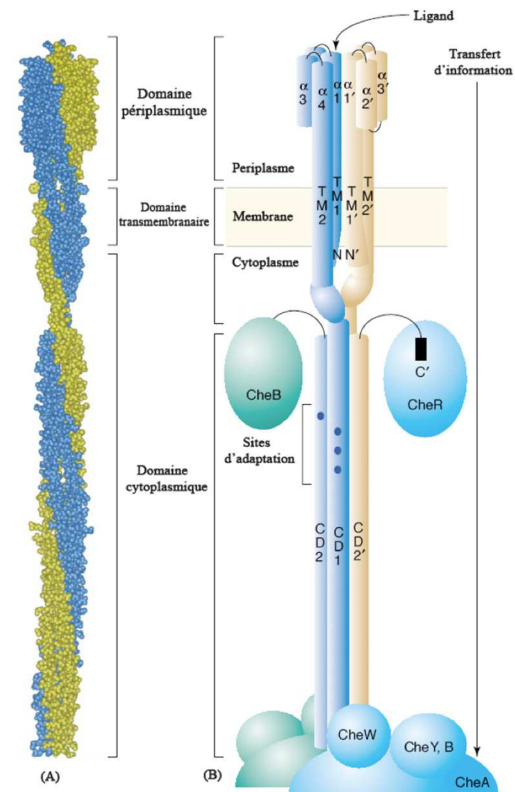


Figure 1.20 : Structure des chémorécepteurs (MCP). (A) Structure cristallographique d'un homodimère de MCP ; (B) représentation schématique de la structure et des régions fonctionnelles d'un homodimère (d'après Falke et Hazelbauer, 2001).

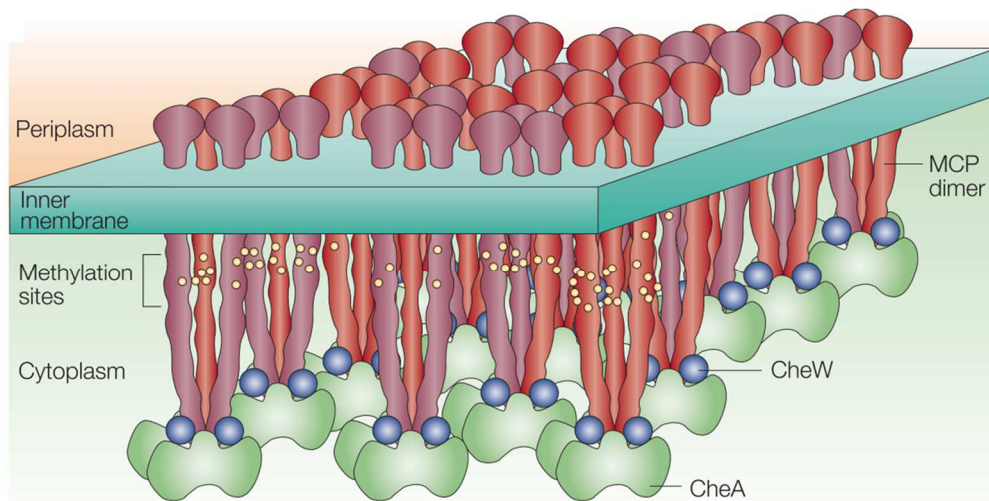


Figure 1.21 : Interaction en trimères d'homodimères de MCP aux pôles des cellules bactériennes (d'après Wadhams et Armitage, 2004).

(FAD) (Key *et al.*, 2007), l'acide 4-hydroxycinnamic (4-HCA) (Pellequer *et al.*, 1998), les acides carboxyliques C3 et C4 (malonate, malate et succinate), les acides carboxyliques C6 (citrate) (Reinelt *et al.*, 2003) et les cations métalliques divalents (Cheung *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008; Green *et al.*, 2009; Möglich *et al.*, 2009; Alexandre, 2010; Schweinitzer et Josenhans, 2010; Henry et Crosson, 2011). Trois classes de PAS ont été décrites. La première classe groupe les Aer (Manson *et al.*, 1998; Gosink, 2006; Alexandre, 2010; Armitano *et al.*, 2013). Les Aer sont ancrés dans la membrane cytoplasmique grâce aux régions transmembranaires. La deuxième classe groupe les AerC. Les AerC sont des MCP cytoplasmiques (Xie *et al.*, 2010). Ils n'ont pas de région transmembranaire leur permettant d'être ancrés dans la membrane cytoplasmique. Les domaines PAS de ces deux premières classes se lient au FAD. Une troisième classe comprend des domaines PAS génériques ne se liant pas au FAD (figure 1.18B).

Il existe d'autres domaines senseurs, les domaines GAF et les domaines CHASE (Zhulin *et al.*, 2003; Cheung et Hendrickson, 2010; Lacal *et al.*, 2010). Le domaine GAF (pour cGMP-dependent phosphodiesterase, Adenylyl cyclases, and *E. coli* FhlA (formate hydrogen lyase transcriptional activator)) (figure 1.18B) détecte le cAMP (cyclic adenosine monophosphate) et le cGMP (cyclic guanosine monophosphate) (Aravind et Ponting, 1997; Zhulin, 2000; Wang *et al.*, 2010; Jäger *et al.*, 2012). Le domaine CHASE (pour Cyclase/Histidine kinase-Associated Sensing Extracellular) détecte diverses petites molécules comme la cytokinine (phytohormone) ou des peptides (Anantharaman et Aravind, 2001; Mougél et Zhulin, 2001; Zhulin *et al.*, 2003; Henry et Crosson, 2011).

3.1.1.2.Organisation spatiale et répartition des MCP

Les MCP sont organisés en trimères d'homodimères (Wadhams et Armitage, 2004; Hazelbauer *et al.*, 2008; Khursigara *et al.*, 2008; Briegel *et al.*, 2009, 2012; He et Bauer, 2014). Un homodimère (figure 1.18, 1.19 et 1.20) est formé de deux copies d'un même MCP. Un trimère (figure 1.21) est constitué d'une combinaison de trois homodimères identiques ou différents (Studdert et Parkinson, 2004; Gosink, 2006). Les MCP sont généralement regroupés et localisés aux pôles de la cellule bactérienne mais peuvent être aussi cytoplasmiques (Maddock et Shapiro, 1993; Lybarger et Maddock, 2000; Sourjik et Berg, 2000; Wadhams *et al.*, 2000, 2002, 2003; He et Bauer, 2014). Ce type d'organisation permet d'amplifier le signal détecté (Gestwicki et Kiessling, 2002; Sourjik, 2004; Parkinson *et al.*, 2005). Ainsi, les bactéries équipées de MCP peuvent détecter des molécules faiblement concentrées (Boldog *et al.*, 2006).

Chez *E. coli*, le nombre de copies de MCP est variable selon le type de MCP. Il y a les MCP fortement abondants (Tar et Tsr, 3000 molécules par cellule) et les MCP faiblement abondants (Tap, Trg et Aer, quelques centaines de molécules par cellule) (Feng *et al.*, 1997; Weerasuriya *et al.*, 1998; Wadhams *et al.*, 2000; Li et Hazelbauer, 2004; Parkinson *et al.*, 2005; Gosink, 2006; Lan *et al.*, 2011).

3.1.1.3. Distribution des gènes codants les MCP

Généralement, chez les bactéries, les gènes codant les MCP sont majoritairement regroupés dans un (des) îlot(s) génomique(s) dédié(s) au chimiotactisme et à la mobilité flagellaire (Darrasse *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2013). Dans les îlots, les *mcp* peuvent être dupliqués et répétés en tandem (Wangs *et al.*, 1982; Moine *et al.*, 2014). Chez les *Xanthomonas*, le nombre de MCP est élevé. Un nombre élevé de MCP répétés en tandem n'est pas commun chez les bactéries. Cela suggère que chez les *Xanthomonas*, les MCP sont importants pour leur mode de vie (Thieme *et al.*, 2005; Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011). Il n'y a pas de corrélation entre le nombre de MCP et la taille du génome, le nombre de MCP est variable dans les espèces en fonction du style de vie de la bactérie (Lacal *et al.*, 2010). Chez les *Enterobacteriaceae*, qui vivent généralement dans un environnement stable, le nombre de MCP est faible (Lacal *et al.*, 2010). Contrairement aux *Enterobacteriaceae*, les bactéries marines comme les *Alteromonadales* et les *Oceanospirales* ont un grand nombre de MCP. C'est également le cas des bactéries ubiquistes du sol et des environnements aquatiques comme les bactéries appartenant à l'ordre *Pseudomonadales* (Timmis, 2002; Daniels *et al.*, 2010; Lacal *et al.*, 2010).

3.1.1.4. Evolution des domaines fonctionnels MA et senseurs des MCP

D'une manière générale, les différents domaines fonctionnels des *mcp* ne sont pas soumis aux mêmes pressions de sélection. Interagissant directement avec les protéines Che responsables de la transduction du signal chimiotactique des MCP à la protéine FlhM du flagelle, le domaine MA est très conservé et est présent dans tous les MCP identifiés à ce jour (Lacal *et al.*, 2010). Les domaines senseurs évoluent plus rapidement que le domaine MA. Ils sont, en effet, fréquemment sujet à des événements de « naissance » et de « mort » et leur séquence varie au cours du temps (Wuichet et Zhulin, 2003; Wuichet *et al.*, 2007). La variabilité de ces séquences est expliquée par le fait que les MCP sont capables de détecter une large gamme de familles de molécules et de signaux différents (Krell *et al.*, 2011).

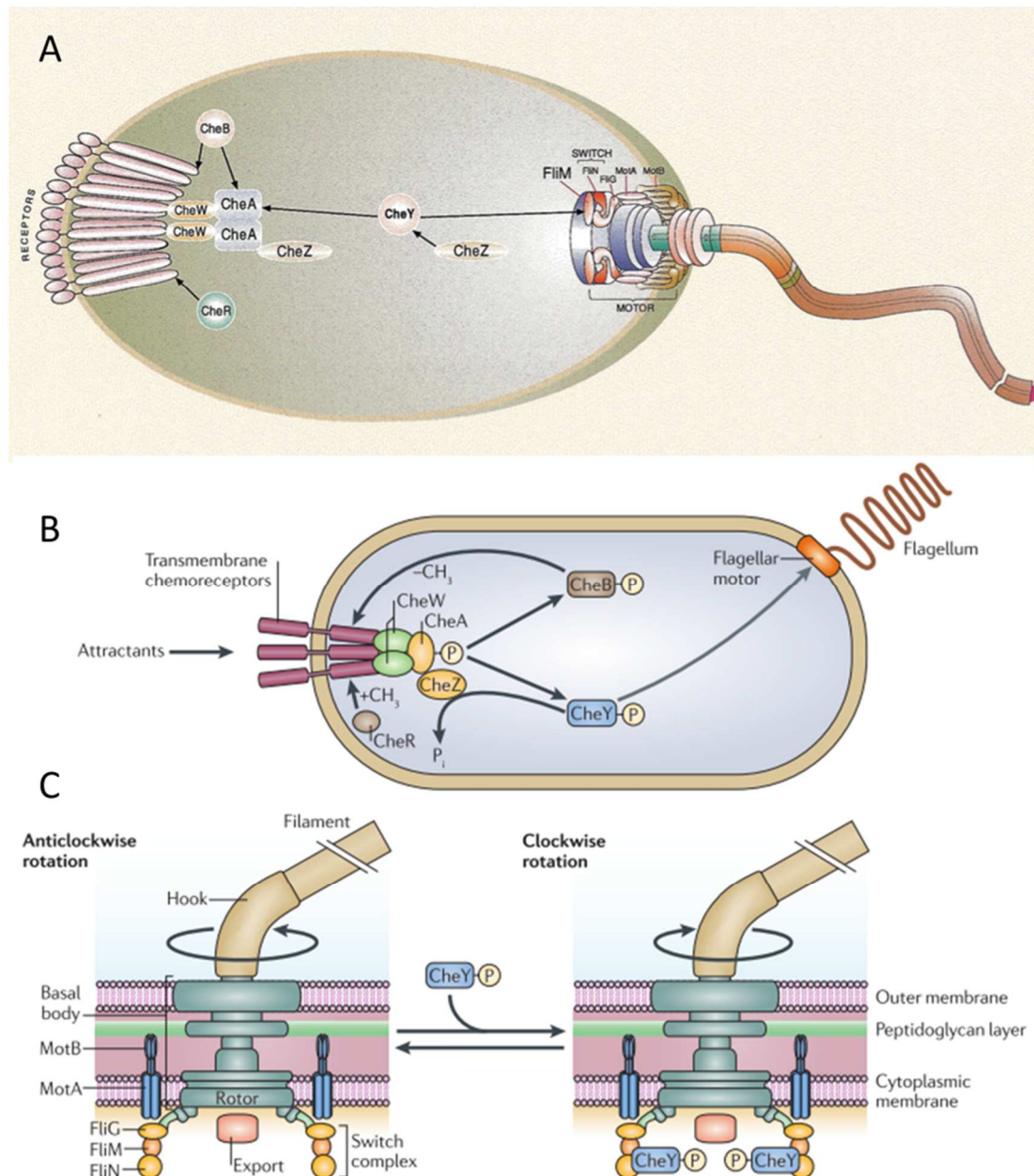


Figure 1.22 : Représentation de la voie de transduction du signal du chimiotactisme chez les bactéries. (A) Ancrés dans la membrane, les chémorécepteurs (MCP) se chargent de détecter des signaux chimiotactiques et de les transmettre aux protéines cytoplasmiques Che. A travers une cascade de phosphorylation, les protéines Che transfèrent le signal jusqu'à la protéine FliM du flagelle, modifiant son sens de rotation. Le schéma n'est pas à l'échelle (d'après Bren et Eisenbach, 2000). (B) Schéma illustrant les méthylations/déméthylations des MCP et phosphorylations/déphosphorylations des protéines Che. (C) Schéma représentant le changement de sens de rotation du flagelle en fonction de l'interaction entre FliM et CheY-P (d'après Porter *et al.*, 2011).

3.1.2. Transduction du signal chimiotactique

3.1.2.1. Mécanismes

La transduction du signal chimiotactique bactérien a été particulièrement étudiée chez *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* (figure 1.22) (Bren et Eisenbach, 2000; Wadhams et Armitage, 2004; Alexandre, 2010; He et Bauer, 2014). Au niveau moléculaire, la transduction du signal chimiotactique comprend une voie de transduction des signaux à deux composantes. L'information perçue par les MCP est transmise au(x) moteur(s) flagellaire(s) par l'intermédiaire d'une série d'événements de phosphorylation initiées par CheA (Alexandre, 2010). Les protéines CheR (méthyltransferase : méthylation des MCP) et CheB (méthylestérase : déméthylation des MCP) ajustent le niveau de méthylation des MCP afin d'activer CheA (Kentner et Sourjik, 2006), une histidine kinase organisée en dimère. Une des protéines CheA catalyse le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP sur la chaîne histidine imidazole de l'autre protéine CheA du dimère. Ce groupement phosphate est ensuite transféré sur une chaîne aspartyl de la protéine CheY (Wadhams et Armitage, 2004; Baker *et al.*, 2006). La forme phosphorylée de CheY (CheY-P) se lie à la protéine FlIM du moteur flagellaire et augmente la probabilité de sens de rotation horaire du flagelle (Brown *et al.*, 2007; Porter *et al.*, 2011). Cela modifie le déplacement de la bactérie dans son environnement (Wadhams et Armitage, 2004; Hazelbauer *et al.*, 2008). La déphosphorylation de CheY-P est réalisée par la phosphatase CheZ (Baker *et al.*, 2006). Ainsi, la forme phosphorylée de CheY constitue le principal signal du système de chimiotactisme. Le contrôle de l'activité kinase de CheA correspond au mécanisme principal par lequel le niveau de CheY-P est régulé (Baker *et al.*, 2006). La protéine CheB est aussi phosphorylée par CheA-P. La phosphorylation de CheB active son activité méthylestérase, ce qui augmente la dé-méthylation des MCP. La dé-méthylation des MCP réduit la capacité d'autophosphorylation de CheA (Wadhams et Armitage, 2004) et limite alors le sens de rotation horaire du flagelle (figure 1.22).

Pour résumer, sans attractant, CheR méthyle les MCP, CheA et CheY sont phosphorylés, CheY-P se lie à FlIM, le flagelle tourne dans le sens des aiguilles d'une montre, le mouvement de la bactérie est alors désordonné. En présence d'un attractant, CheB-P déméthyle les MCP, CheA est déphosphorylée et CheZ déphosphoryle CheY (Porter *et al.*, 2011). Le flagelle tourne dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (sens par défaut), la bactérie nage vers l'attractant.

Les bactéries ont une mémoire chimiotactique (Vladimirov et Sourjik, 2009; Guzmán *et al.*, 2010; Vladimirov *et al.*, 2010; Hazelbauer, 2012a, 2012b; Yuan *et al.*, 2012). Lorsqu'elles sont dans un gradient de concentration, cette mémoire leur permet de comparer les concentrations précédentes à la concentration actuelle et de se diriger vers la concentration optimale (Szurmant et Ordal, 2004; Guzmán *et al.*, 2010). La mémoire chimiotactique est dépendante de la vitesse de méthylation et déméthylation des MCP. La méthylation étant plus lente que la déméthylation (réponse par défaut), la méthylation constitue la mémoire chimiotactique des bactéries permettant la comparaison des concentrations rencontrées récemment dans le passé (Vladimirov *et al.*, 2010). *E. coli* et *Salmonella* ont une mémoire chimiotactique d'environ une seconde, la mémoire optimale étant de 1 à 10 secondes (Koshland, 1974, 1981).

3.1.2.2. Rôle du chimiotactisme dans la colonisation de l'hôte

De nombreuses études montrent que le chimiotactisme est important dans les premières phases de l'interaction entre la bactérie et son hôte. Des mutants de *Ralstonia solanacearum* dans les gènes *cheA* et *cheW* sont altérés dans leur virulence sur tomate (Yao et Allen, 2006). Les auteurs concluent que le chimiotactisme contribue à une fitness compétitive et optimale pendant les phases d'invasion et de colonisation des plants de tomate. En 2002, de Weert et collègues montrent que le chimiotactisme est important pour la colonisation de la racine de tomate par *Pseudomonas fluorescens*. En effet, ils ont muté le gène *cheA* chez quatre souches sauvages de *P. fluorescens*. Une co-inoculation à la même concentration de plants de tomate avec *P. fluorescens* sauvage et son mutant dans le gène *cheA*, montre que le mutant est 10 à 1000 fois moins efficace que la souche sauvage dans la colonisation de la racine des plants de tomate. Des souches de *E. coli* isolées de différents hôtes (carnivores, herbivores et omnivores) montrent une différence de comportement vis-à-vis de deux acides aminés attractifs (Dzinic *et al.*, 2008). Cette étude démontre que les souches isolées des carnivores répondent significativement plus à l'aspartate qu'à la sérine. Quant aux souches isolées d'herbivores, elles répondent de façon équivalente ou supérieure à la sérine par rapport à l'aspartate. Cela suggère que le chimiotactisme intervient de façon importante dans la colonisation spécifique de l'hôte (Dzinic *et al.*, 2008). D'autres données suggèrent que la colonisation des racines de tomate par *Bacillus amyloliquefaciens* T-5 est influencée par les acides organiques sécrétés par les racines. Ces acides organiques induisent le chimiotactisme et la mobilité par essaimage de cette souche (Tan *et al.*, 2013). Des mutants de *Dickeya dadantii* dans les gènes *cheB*, *cheW*, *cheY* et *cheZ* sont affectées dans leur virulence sur chicorée (María Antúnez-Lamas *et al.*, 2009). Le

chimiotactisme et l'aérotactisme confèrent un avantage à *Salmonella typhimurium* pour provoquer la colite de la souris (Rivera-Chávez *et al.*, 2013). Un double mutant de *Ralstonia solanacearum* dans les gènes *aer1* et *aer2* est altéré dans sa capacité à détecter et coloniser les racines des plants de tomate par rapport au sauvage (Yao et Allen, 2007). Un autre étude montre qu'un mutant d'*Azospirillum brasilense* dans un *mcp* codant Tlp1 est très altéré dans sa capacité à coloniser la racine de blé (Greer-Phillips *et al.*, 2004).

3.2. Mobilité flagellaire

Pour se déplacer et nager dans leur environnement, certaines bactéries sont pourvues d'un ou de plusieurs flagelles. Différentes ciliatures existent (Leifson, 1951; Leifson et Hugh, 1953). Si n'y a qu'un seul flagelle polaire, plusieurs flagelles polaires, un flagelle à chaque pôle ou beaucoup de flagelles autour de la cellule, les bactéries sont respectivement dites à ciliature monotriche (*Xanthomonas*, *Vibrio*...), lophotriche (*Pseudomonas*...), amphitriche ou pétriche (*Erwinia*, *Escherichia coli*) (Fujii *et al.*, 2008; Kazmierczak et Hendrixson, 2013). La mobilité par nage autrement appelée « swimming motility » est la mobilité flagellaire des bactéries dans un milieu liquide ou semi-liquide (maximum 0,4 % d'agar). La mobilité par nage est initiée par une cellule bactérienne. La mobilité en essaim ou « swarming motility » est la mobilité flagellaire des bactéries dans un milieu plus visqueux (de 0,3 à 0,7 % d'agar). Cette mobilité est organisée et touche plusieurs cellules bactériennes, d'où l'appellation mobilité en essaim. Chez *E. coli*, le moteur flagellaire fonctionne grâce à l'énergie donnée par la force proton motrice générée à travers la membrane bactérienne (Soutourina et Bertin, 2003). Dans ce cas, le moteur flagellaire tourne en moyenne entre 170 et 250 Hz (en passant par 0 et 300 Hz) (Lowe *et al.*, 1987; Soutourina et Bertin, 2003; Murphy *et al.*, 2006; Xing *et al.*, 2006; Bai *et al.*, 2012). Chez *Vibrio alginolyticus*, la force est générée par des canaux sodium. Dans ce cas, le moteur flagellaire peut tourner à environ 1700 Hz (Magariyama *et al.*, 1994; Soutourina et Bertin, 2003; Thormann et Paulick, 2010). La vitesse de nage des bactéries est variable en fonction de l'espèce considérée. Elle oscille en moyenne entre 15 et 100 $\mu\text{m/s}$ (Berg, 2003; Sowa et Berry, 2008; Bai *et al.*, 2012). Chez *E. coli*, la vitesse moyenne de nage dans l'eau est de 25 $\mu\text{m/s}$. Chez *Rhodobacter sphaeroides*, cette vitesse est plutôt de l'ordre de 35 $\mu\text{m/s}$ (Ping, 2012). Certaines bactéries marines peuvent aller jusqu'à 300 $\mu\text{m/s}$ voire 400 $\mu\text{m/s}$. C'est le cas des bactéries ovoïdes magnétotactiques comme la souche MO-1 (Mitchell *et al.*, 1995; Johansen et

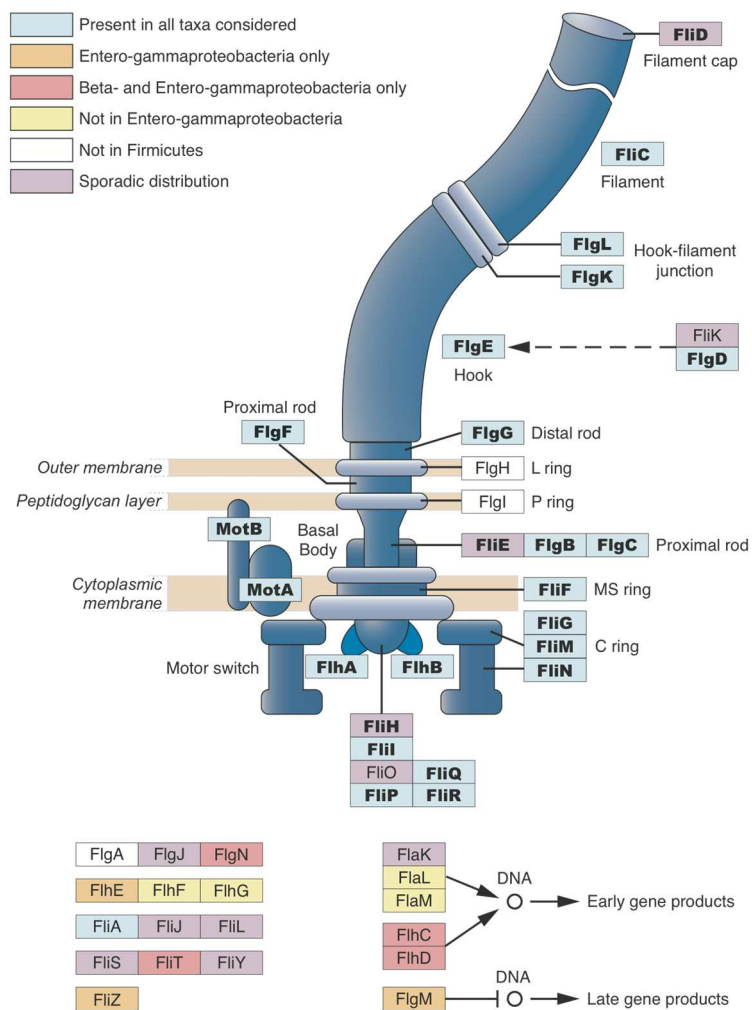


Figure 1.23 : Structure du flagelle et organisation des protéines flagellaires. Les protéines en gras sont codées par les gènes du « core » du système flagellaire (d'après Liu et Ochman, 2007).

Pinhassi, 2002; Locsei et Pedley, 2009; Zhang *et al.*, 2012). A l'heure actuelle, le record de vitesse est attribué à *Thiovulum majus*, qui mesure entre 5 et 25 μm de diamètre et qui peut aller à une vitesse supérieure à 600 $\mu\text{m/s}$ (Fenchel, 1994; Johansen et Pinhassi, 2002).

3.2.1. Biosynthèse et structure du flagelle

Le flagelle est un complexe protéique composé de 3 parties : (i) un corps basal complexe composé d'un cylindre central et d'une série d'anneaux superposés, (ii) une structure courte incurvée en crochet et (iii) un long filament hélicoïdal (figure 1.23) (Vonderviszt et Namba, 2000; Macnab, 2003; Liu et Ochman, 2007; Büttner, 2012).

- (i) Chez *Salmonella typhimurium* (Aldridge *et al.*, 2006), le corps basal comprend quatre anneaux localisés dans le cytoplasme (anneau C), la membrane interne (anneau MS), le peptidoglycane (anneau P) et la membrane externe (anneau L). Chez *Vibrio*, la structure et la biosynthèse du flagelle sont similaires à celles de *Salmonella typhimurium* (Zhu *et al.*, 2013). La biosynthèse du flagelle commence par l'anneau MS (FliF) (Vonderviszt et Namba, 2000). La biosynthèse continue avec l'anneau C (FliG, FliM et FliN). C'est le complexe protéique qui permet au flagelle de changer de sens de rotation (Brown *et al.*, 2007). Puis, l'assemblage des protéines FlhA, FlhB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ et FliR constitue l'appareil de sécrétion de type III flagellaire. Le cylindre qui est situé au centre du flagelle est composé de FliE, FlgF, FlgB, FlgG, FlgC et FlgJ. Ensuite, les anneaux P (FlgA et FlgI) puis L (FlgH) sont synthétisés. Tous ces anneaux forment le corps basal du flagelle (Liu et Ochman, 2007). Une fois le cylindre mature, la biosynthèse du flagelle continue par la synthèse du crochet (FlgE).
- (ii) Le crochet est constitué d'environ 130 sous unités de FlgE (50-60 nm). FlgD a un rôle d'échafaudage permettant à FlgE d'initier sa polymérisation (Ohnishi *et al.*, 1994; Moriya *et al.*, 2006, 2011). La jonction entre le crochet et le filament est constituée de FlgK et FlgL (Homma et Iino, 1985; Ikeda *et al.*, 1985).
- (iii) Puis, la sécrétion de la flagelline (FliC) entre FlgL et FliD est réalisée par l'appareil de sécrétion de type III flagellaire. FliD est la protéine chapeau (« cap protein ») à l'extrémité de FliC, vers l'extérieur (Ohnishi *et al.*, 1994; Ikeda *et al.*, 1996; Inaba *et al.*, 2013). La similarité de structure entre le flagelle et le SST3 est remarquable (Blocker *et al.*, 2001; Holmes *et al.*, 2003; Macnab, 2003; Erhardt *et al.*, 2010) (figure 1.24). L'ATPase FliI permet à l'appareil de sécrétion d'avoir de l'énergie

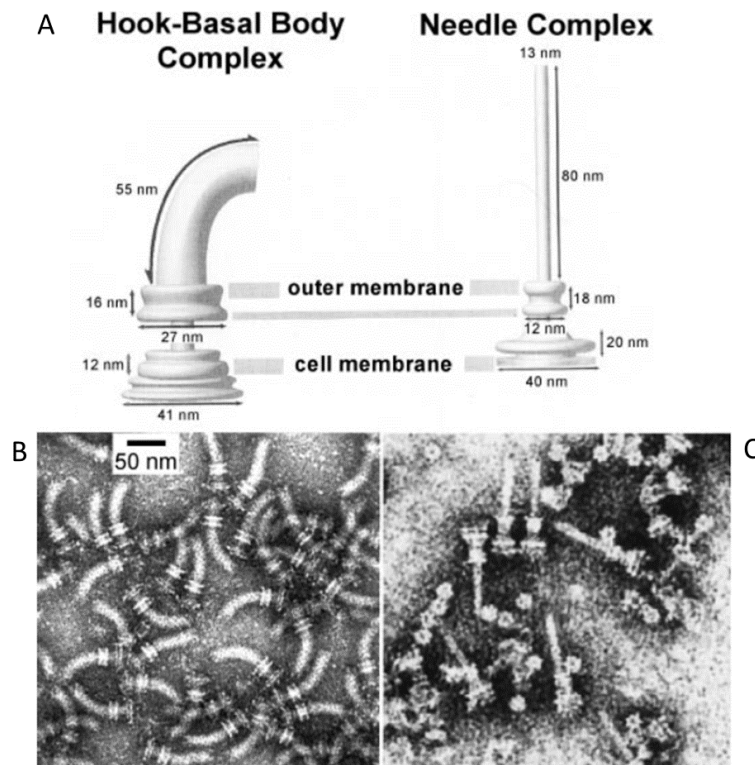


Figure 1.24 : (A) Comparaison schématique des différents composants du système de sécrétion du flagelle et du système de sécrétion de type III. (B) Photographie en microscopie électronique à transmission du corps basal et du crochet du flagelle. (C) Photographie en microscopie électronique à transmission du système de sécrétion de type III. Barre d'échelle : 50 nm (d'après Macnab, 2003).

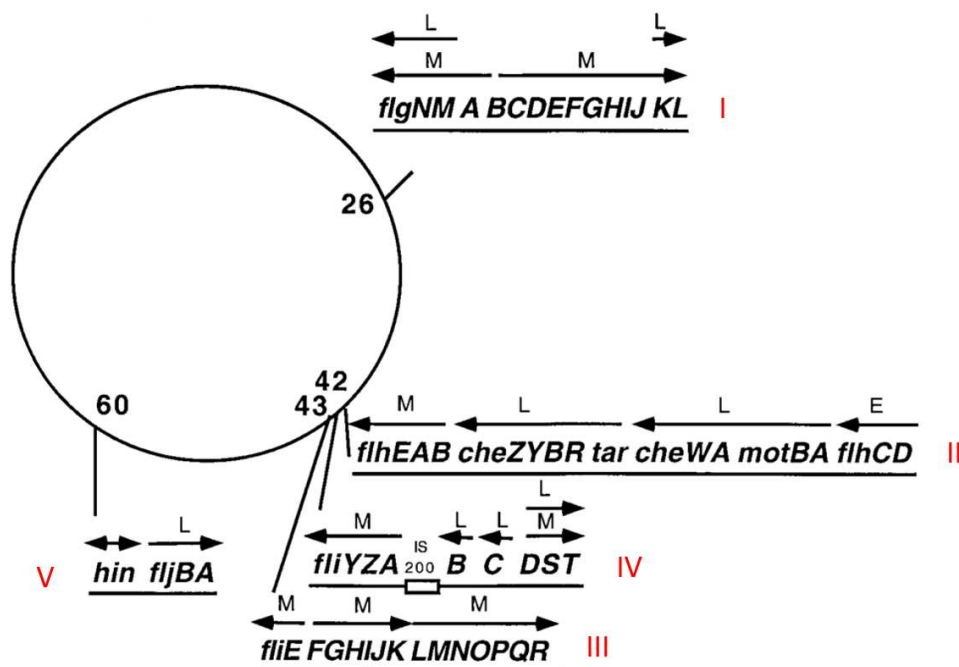


Figure 1.25 : Localisation chromosomique des opérons formant le régulon flagellaire chez *Salmonella enterica* serovar typhimurium. Les opérons sont notés E, M ou L selon le moment de leur expression (E pour « early » ou précoce, M pour « middle » ou intermédiaire et L pour « late » ou tardive). (d'après Chilcott et Hughes, 2000).

pour sécréter FliC et construire le filament (Konishi *et al.*, 2009). La longueur du filament varie en fonction du nombre de flagellines FliC sécrétées. Le filament est en effet constitué de 10 000 à 40 000 unités de FliC (Liu et Ochman, 2007).

MotA et MotB sont les staturs du flagelle. Ces protéines créent des canaux permettant aux protons de passer pour générer la force proton-motrice et permettre au flagelle de tourner (Blair et Berg, 1991; Blair *et al.*, 1991; Blair, 2003; Hossain *et al.*, 2005; Charon *et al.*, 2012). Ces protéines qui sont essentielles au bon fonctionnement du moteur flagellaire ne sont, par contre, pas indispensables à la biosynthèse du flagelle (Blair et Berg, 1991; Blair *et al.*, 1991; Ottemann et Lowenthal, 2002; Wilharm *et al.*, 2004; Hossain *et al.*, 2005). FlgN, FliS et FliT sont respectivement des chaperonnes de FlgK et FlgL, FliC, FliD. FliJ est une chaperonne générale (Bennett *et al.*, 2001; Bardy *et al.*, 2003; Macnab, 2003).

3.2.2. Organisation et régulation des gènes flagellaires

L'organisation et la régulation des gènes flagellaires ont été bien étudiées chez *Salmonella typhimurium* et *E. coli*. Environ 60 gènes regroupés en quatre ou cinq clusters (figure 1.25) codent des protéines de la structure du flagelle (cluster I), de la régulation, de l'assemblage, du moteur flagellaire et des gènes du chimiotactisme (cluster II), de l'appareil de sécrétion de type III flagellaire, de la flagelline et des facteurs sigma spécifiques du flagelle (cluster III et IV). Chez *Salmonella*, un cinquième cluster code FljB, qui est une flagelline alternative à FliC exprimée lors de la variation de phase de *Salmonella enterica*. Lorsque FljB est exprimé, *fljA* est transcrit au même moment. *fljA* code un répresseur transcriptionnel du gène codant FliC (Bonifield et Hughes, 2003; McQuiston *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2013). L'expression des gènes flagellaires est régulée par des facteurs externes tels que, la température, le pH, l'osmolarité, les sources carbonées (Soutourina et Bertin, 2003; Smith et Hoover, 2009). Plusieurs régulateurs de l'expression des gènes flagellaires ont été identifiés. FliA est un facteur sigma (σ^{28}) qui régule l'expression des gènes codant des protéines tardives du flagelle, comme *fliC* (Ohnishi *et al.*, 1990; Jubelin *et al.*, 2011). FliZ est aussi un régulateur des gènes codant le flagelle (Lanois *et al.*, 2008; Jubelin *et al.*, 2011, 2013). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, FleN régule le nombre de flagelles synthétisés au pôle de la cellule bactérienne. En effet, chez *P. aeruginosa*, un mutant *fleN* a un nombre de flagelles supérieur à celui du parent (Dasgupta *et al.*, 2000). La protéine FleQ est un facteur sigma (σ^{70}). C'est le régulateur majeur de la biosynthèse du flagelle chez *P. aeruginosa* (Dasgupta *et al.*, 2002). RpoN est un facteur sigma (σ^{54}). Des mutants dans le gène *rpoN* ont un système flagellaire non fonctionnel. Ces mutants

n'expriment pas la flagelline (Jagannathan *et al.*, 2001; Dasgupta *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2014).

3.2.3. Rôle du flagelle dans la colonisation de l'environnement

Conférant la mobilité aux bactéries qui en sont munies, le système flagellaire est considéré comme un facteur d'agressivité pour de nombreuses bactéries pathogènes. La virulence est définie comme étant la capacité d'un agent pathogène à provoquer une maladie sur un hôte, c'est un caractère qualitatif (Casadevall et Pirofski, 1999, 2010). L'agressivité est définie comme étant la quantité de symptômes qu'un agent pathogène peut produire sur son hôte, c'est une composante quantitative du pouvoir pathogène (Lannou, 2012). De nombreuses études montrent que des mutants du flagelle sont altérés dans leur agressivité. En effet, chez de nombreuses bactéries, le flagelle est essentiel pour la réussite de la colonisation de l'hôte (Josenhans et Suerbaum, 2002). En effet, Malamud et collègues (2011) ont, par exemple, montré que le flagelle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* est un déterminant de la formation de biofilm mature à la surface foliaire de la feuille de citronnier et, par conséquent, pour le développement du chancre citrique. Chez *Vibrio cholerae*, le flagelle intervient surtout pour son rôle dans la mobilité qui permet à la bactérie de traverser la couche visqueuse de mucus et atteindre l'épithélium intestinal pour exercer son pouvoir pathogène (Richardson, 1991; Butler et Camilli, 2004, 2005). Chez *Yersinia enterocolitica*, des mutants non mobiles sont moins invasifs dans l'hôte par rapport aux souches mobiles (Young *et al.*, 2000). Une souche non mobile de *Dickeya dadantii* mutée dans le gène *motA* est affectée dans son agressivité sur chicorée (María Antúnez-Lamas *et al.*, 2009). Chez *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, le pouvoir pathogène des mutants non mobiles dans les gènes *fliC* et *motA* est réduit (Hossain *et al.*, 2005).

Cependant, le flagelle est aussi un désavantage pour la bactérie lors de certaines phases de l'interaction avec son hôte. En effet, la flagelline du flagelle est aussi un éliciteur des réactions de défenses des plantes (figure 1.14 et 1.15) (Gómez-Gómez et Boller, 2002). Elle est également connue comme étant capable d'induire la mort cellulaire chez les dicotylédones (Naito *et al.*, 2007). Plus précisément, c'est la zone conservée de la partie N-terminale de la flagelline qui est responsable de l'induction des défenses des plantes. Cette zone, appelée flg22, est reconnue par la protéine de résistance des plantes FLS2 (Chinchilla *et al.*, 2006; Naito *et al.*, 2007). Dans leur processus d'infection, certaines bactéries se servent de leur flagelle juste pour rejoindre des sites favorables à l'installation. Ensuite, lorsqu'elles sont dans leur phase de multiplication dans

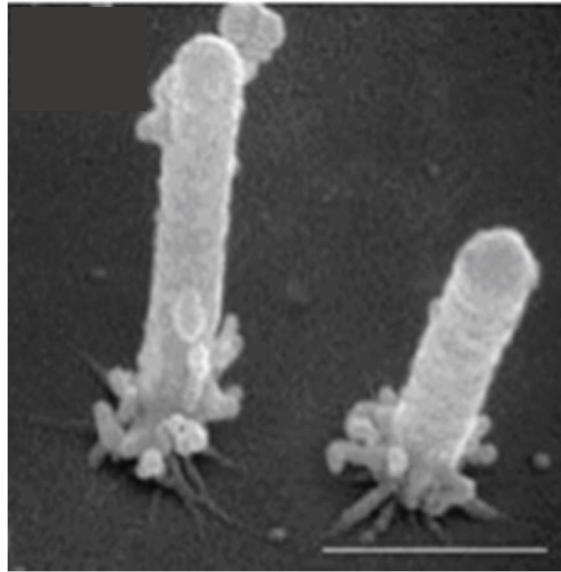


Figure 1.26 : Pili de type IV observés en microscopie électronique à balayage chez *Xyella fastidiosa*. La barre d'échelle représente 1 μ m (d'après Meng *et al.*, 2005).

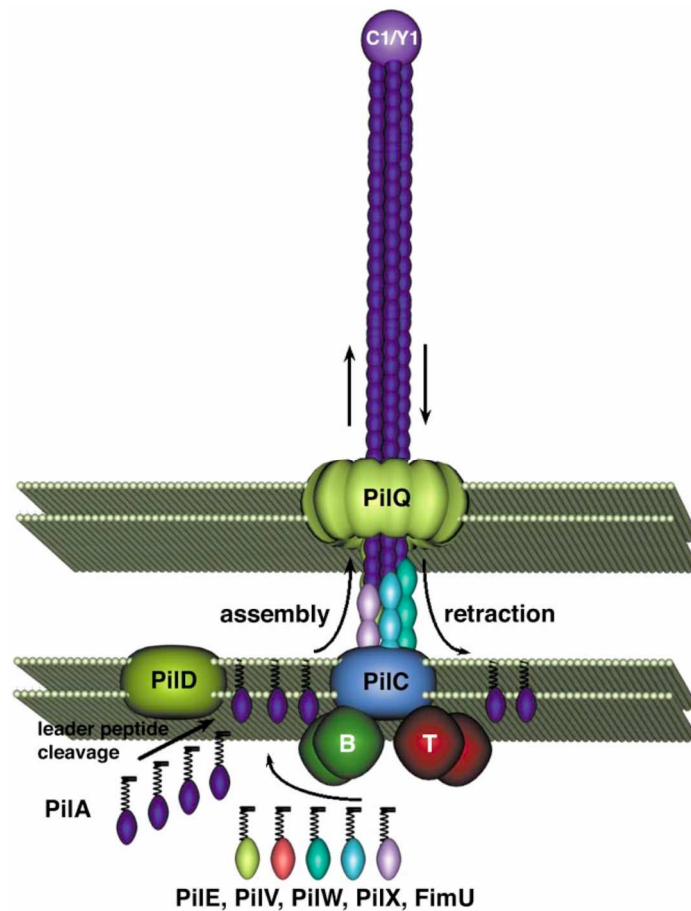


Figure 1.27 : Modèle d'extension et de rétraction du pilus de type IV. L'extension de ce pilus est faite par PilB et PilC tandis que la rétraction est faite par PilT (d'après Mattick, 2002).

les espaces intercellulaires ou dans les vaisseaux du xylème, elles le perdent. C'est par exemple le cas de la bactérie *Erwinia amylovora*. En effet, cette bactérie perd ses flagelles lorsqu'elle entre à l'intérieur de la plante (Cesbron *et al.*, 2006). Les mutants de *Salmonella thyphimurium* dans les gènes *fliC/fljB* sont plus agressifs que le parent (Olsen *et al.*, 2013). Une autre étude montre que la diversification allélique des MAMP du flagelle (flg22 et flgII-28) est une stratégie de virulence chez *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Clarke *et al.*, 2013). Les auteurs ont montré que la détection de flgII-28 est restreinte à quelques espèces de *Solanaceae*. L'expression d'un allèle de FLS2 de la tomate ne confère pas, à *Nicotiana benthamiana*, la capacité à détecter flgII-28. Chez la tomate, des mutants FLS2 détectent toujours flgII-28. Ils font alors l'hypothèse de l'existence d'un co-récepteur qu'ils appellent FLS3. Sun et collègues (2006) ont montré que des extraits bruts d'une collection de 12 souches de *Xcc* élicitent de manière variable les réactions de défenses. Cette variabilité est due au polymorphisme de la région flg22. Le polymorphisme de l'acide aminé en position 43 détermine la détection de flg22 par *Arabidopsis*.

Il a été montré que le flagelle pouvait avoir d'autres rôles que la mobilité comme, par exemple, la sécrétion de facteur de virulence et l'adhésion. Chez *Campylobacter jejuni*, la sécrétion des protéines Cia (*Campylobacter* invasion antigens) passe effectivement par l'appareil de sécrétion du système flagellaire (Konkel *et al.*, 2004). D'autres études chez *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* montrent que le flagelle est un déterminant de l'adhésion et de la formation de biofilm (Pratt et Kolter, 1998; Klausen *et al.*, 2003; Prüss *et al.*, 2006; Conrad, 2012; Duan *et al.*, 2013; Haiko et Westerlund-Wikström, 2013).

3.3. Autres types de mobilité

La mobilité flagellaire n'est pas le seul moyen utilisé par les bactéries pour se mouvoir (Kearns, 2010). En effet, le pilus de type IV est impliqué dans la « twitching motility » des bactéries qui en sont pourvues (Wall et Kaiser, 1999; Shi et Sun, 2002; Meng *et al.*, 2005; Bahar *et al.*, 2009). Ce mouvement est aussi bien efficace sur des surfaces biotiques que sur des surfaces abiotiques (Mattick, 2002). Le pilus de type IV va alterner entre des phases d'extension, d'accrochage aux surfaces et de rétraction du pilus faisant avancer la bactérie de façon saccadée (figure 1.26 et 1.27). Chez *P. aeruginosa*, la vitesse de déplacement au moyen du pilus de type IV est estimée à 0,2 µm/s (Skerker et Berg, 2001). L'extension (assemblage de

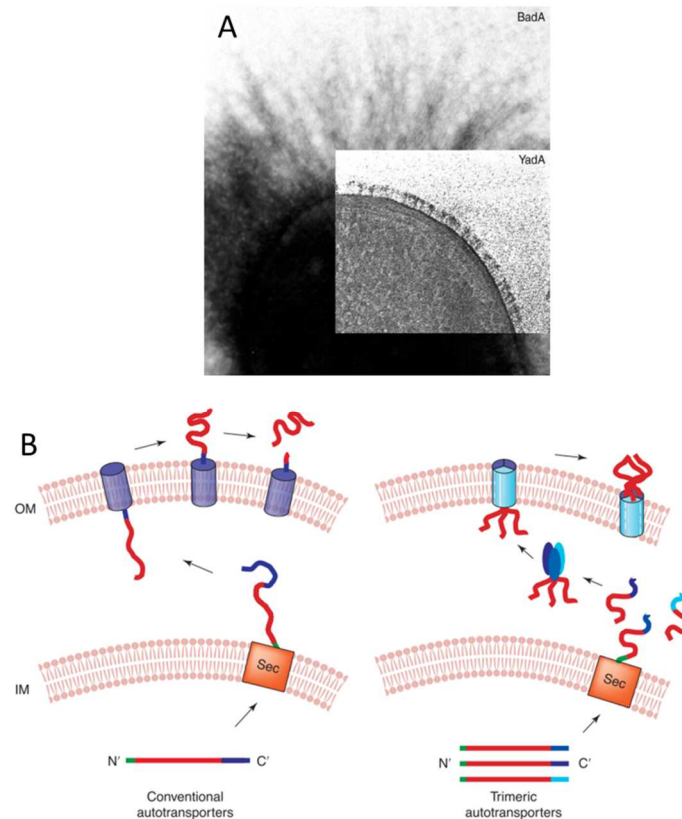


Figure 1.28 : Autotransporteurs chez les bactéries. (A) Longueurs de YadA (~ 23 nm) et BadA (~ 300 nm) observées en microscopie électronique à transmission en coloration négative (Linke *et al.*, 2006). (B) Sécrétion des autotransporteurs. Les autotransporteurs conventionnels (comme BadA) sont clivés à la surface de la bactérie, après le passage de la membrane externe. Les autotransporteurs trimériques ne sont pas clivés à la surface de la bactérie (d'après Cotter *et al.*, 2005).

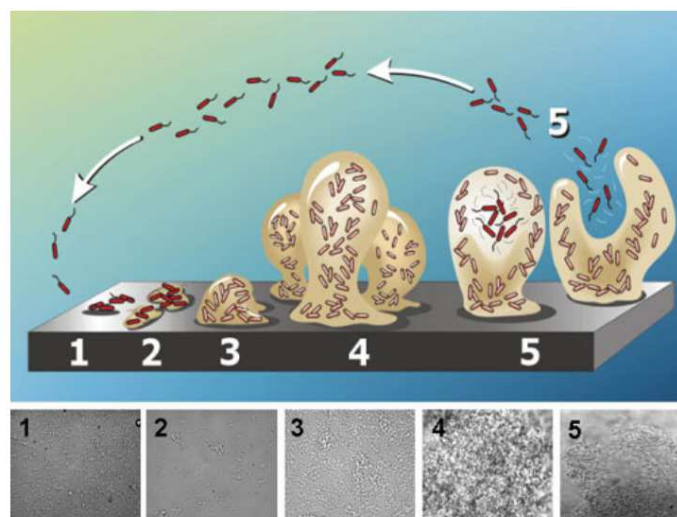


Figure 1.29 : Illustration des étapes de la formation d'un biofilm. Etape 1 : attachement initial des cellules aux surfaces. Etape 2 : production d'EPS favorisant l'attachement irréversible des cellules bactériennes. Etape 3 : développement précoce du biofilm. Etape 4 : maturation de l'architecture du biofilm. Etape 5 : dispersion de cellules bactériennes isolées du biofilm mature. Les photographies de *Pseudomonas aeruginosa*, au microscope électronique à transmission, représentent chaque étape de la formation d'un biofilm sur une lame de verre (d'après Stoodley *et al.*, 2002).

la piline) est réalisée grâce à PilB tandis que la rétraction (désassemblage de la piline) est réalisée par PilT à une vitesse environ de l'ordre de 1000 à 1500 sous-unités de piline par seconde (Merz *et al.*, 2000; Mattick, 2002). L'extension et la rétraction sont réalisés à un rythme moyen de 0,5 $\mu\text{m/s}$ (Skerker et Berg, 2001). Les mutants *pilT* sont incapables de rétracter leurs pili de type IV, leur conférant un phénotype hyperpilié et incapable de twitching motility (Mattick, 2002; Salzer *et al.*, 2014). Il a été montré chez *X. campestris pv. campestris* que les gènes, codant pour des protéines impliquées dans la twitching motility, sont surexprimés dans la sève brute (provenant du xylème) (Dugé de Bernonville *et al.*, 2014). En plus de la swimming, la swarming et la twitching motility, deux autres types de mobilité existent : la gliding motility (Nan et Zusman, 2011; Nan *et al.*, 2013) et la sliding motility (Martínez *et al.*, 1999; Murray et Kazmierczak, 2008). Ces deux types de mobilité ne sont ni dépendantes du flagelle ni du pilus de type IV. La gliding motility semble impliquer des structures multiprotéiques complexes, des protéines de régulation et des filaments du cytosquelette. La sliding motility est une mobilité d'étalement par la croissance d'une colonie bactérienne. Les cellules se poussent entre elles en se multipliant.

3.4. Adhésion et formation de biofilm, installation des bactéries sur leur hôte

Lors des premières étapes de l'interaction avec la plante, la bactérie va tout d'abord détecter un site favorable grâce à ses senseurs du chimiotactisme et s'y diriger. Elle va ensuite s'y fixer et former une microcolonie. C'est l'étape initiale de la formation de biofilms. L'étape d'adhésion des bactéries est réalisée *via* des adhésines protéiques (non fibrillaires et fibrillaires) et/ou polysaccharidiques (exopolysaccharides -pour EPS- et lipopolysaccharides -pour LPS-).

Les adhésines non fibrillaires ont été identifiées chez les α -, β - et γ -protéobactéries. Ces adhésines appartiennent à une famille très large de mono- ou d'oligo-mères de protéines de surface (Gerlach et Hensel, 2007) comprenant des autotransporteurs trimériques (TAA : Trimeric Autotransporter Adhesins ou type Va) tels que XadA et YadA (figure 1.28) (Desvaux *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005; Linke *et al.*, 2006; Gerlach et Hensel, 2007), et des systèmes de sécrétion à deux partenaires (TPS : two-partner secretion system ou type Vb) comme les hémagglutinines filamenteuses tels que FhaB et YapH (Henderson et Navarro-garcia, 2004;

Mazar et Cotter, 2006; Darsonval *et al.*, 2009). Chez *X. fuscans* subsp. *fuscans* (*Xff*), une mutation du gène *yapH* supprime la formation de biofilms et l'adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques (type polypropylène) (Darsonval *et al.*, 2009). La protéine YapH est donc essentielle pour l'adhésion de la bactérie aux graines, aux feuilles et aux surfaces abiotiques. Cette étape est considérée comme étant la première étape de la formation d'un biofilm (figure 1.29) (Stoodley *et al.*, 2002). En ce qui concerne l'attachement, le processus de formation d'un biofilm résulterait de la contribution successive d'adhésines non-fibrillaires comme YapH pour initier l'attachement des cellules aux surfaces abiotiques puis d'adhésines fibrillaires. Il a aussi été montré que le mutant *yapH* de *Xff* est hyper-agressif (Darsonval *et al.*, 2009).

Les adhésines fibrillaires ou pili de type IV (TFP) ont généralement un diamètre compris entre 5 et 7 nm et peuvent s'allonger de quelques micromètres (figure 1.26 et 1.27). Environ 40 gènes sont impliqués dans la biosynthèse et les fonctions mécaniques des pili (Mattick, 2002). La biosynthèse des TFP est régulée par le facteur σ^{34} (RpoN) (da Silva Neto *et al.*, 2007). La protéine structurale majeure des TFP est appelée la piline (PilA). La piline est arrangée en hélice avec une conformation de 5 sous-unités par tour. Le gène *pilD* code une enzyme de clivage permettant le passage de PilA de la forme immature à la forme mature (Mattick, 2002). Ces structures permettent d'une part, l'adhésion des bactéries à la surface foliaire et d'autre part, l'adhésion des bactéries entre elles pour la formation de colonies (Bahar *et al.*, 2009; Darsonval *et al.*, 2009). Il a aussi été montré que des mutants *pilA* de *Vibrio vulnificus* étaient altérés dans la formation de biofilm tridimensionnel (Paranjpye et Strom, 2005). Le gène *pilA* est aussi impliqué dans la transmission vasculaire de *Xff* à la graine mais pas dans la transmission par la voie florale (Darsonval *et al.*, 2009).

Les adhésines polysaccharidiques interviennent aussi dans l'adhésion des cellules bactériennes et dans la formation de biofilm (Danhorn et Fuqua, 2007). En effet, les EPS et LPS sont des structures externes polysaccharidiques (Roper *et al.*, 2007; Vu *et al.*, 2009; Hori et Matsumoto, 2010). Danese et collègues (2000) ont montré que la production d'EPS était nécessaire pour le développement de la structure en biofilm d'*E. coli*. D'autres études montrent que la proportion d'EPS dans les biofilms pouvait être comprise entre 50 et 90 % de la matière organique totale (Donlan, 2002; Vu *et al.*, 2009; Flemming et Wingender, 2010). La capacité d'adhésion de *Helicobacter pylori* dépend aussi de la biosynthèse de LPS (Chang *et al.*, 2011). La plupart des bactéries vasculaires des plantes produisent de grandes quantités d'EPS. Cela conduit à la formation de biofilms obstruant les vaisseaux de la plante. Les tissus végétaux à

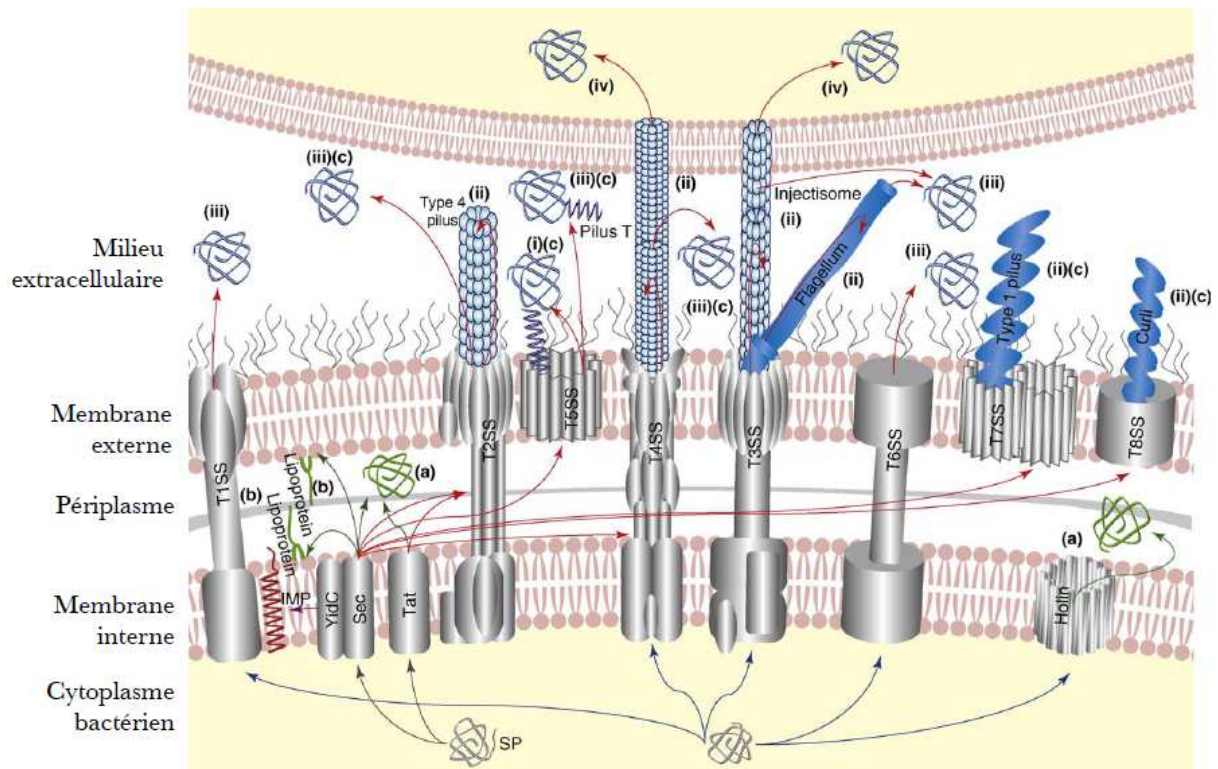


Figure 1.30 : Représentation schématique et localisation cellulaire des effecteurs des huit systèmes de sécrétion des bactéries à Gram négatif. Les effecteurs peuvent être (i) ancrés dans la membrane externe et localisés à la surface cellulaire comme c'est le cas pour les protéines du T5SS ; (ii) des appendices de la surface cellulaire comme le flagelle ou les structures de type pilus, (pilus de type IV *via* le T2SS, l'injectisome *via* le T3SS, le flagelle *via* le T3SS, le pilus de type T *via* le T4SS, le pilus de type I *via* le T7SS (chaperone-user pathway) ou le curli *via* le T8SS (extracellular nucleation-precipitation pathway)) ; (iii) relargués dans le milieu extracellulaire *via* les T1SS, T2SS, T3SS, T4SS, T5SS et T6SS ; (iv) directement injectés dans une cellule eucaryote ou procaryote *via* les T3SS et T4SS. Les protéines exportées sont (a) relarguées dans le périplasma *via* les systèmes de translocation tels que Sec, Tat ou Holin ; (b) des lipoprotéines ancrées soit dans la membrane interne, soit dans la membrane externe du côté périplasmique *via* le système Lol ; (c) sujettes à une seconde translocation à travers la membrane externe *via* les T2SS, T4SS, T5SS, T7SS ou T8SS. Les flèches noires indiquent les voies des protéines ciblées à la CM et présentant un peptide signal N-terminal ciblées pour les systèmes de translocation membranaires, tandis que les flèches bleues indiquent les voies utilisées par des protéines qui n'ont pas de peptide signal. Les flèches rouges sont liées à la sécrétion. Les flèches violettes sont liées à l'intégration de protéines membranaires (IMP). Les flèches vertes sont liées à l'exportation. Les protéines sécrétées sont en bleu et les protéines exportées sont de couleur verte. Abréviations: Cyto, cytoplasme; CM, membrane cytoplasmique (interne); Peri, périplasma; OM, la membrane externe; Ext, milieu extracellulaire (d'après Desvaux *et al.*, 2009).

proximité ne sont plus alimentés par les vaisseaux et dépérissent (Tyson *et al.*, 1985; Newman *et al.*, 2003; Danhorn et Fuqua, 2007).

Chez *X. campestris* pv. *campestris*, la formation de biofilm est négativement régulée par la production de DSF (Diffusible Signal Factor) (Dow *et al.*, 2003; Crossman et Dow, 2004; He *et al.*, 2007; He et Zhang, 2008; Ryan et Dow, 2010; Ryan *et al.*, 2010). DSF affecte l'expression d'une endo- β -1,4-mannanase *manA*. Cette enzyme est effectivement capable de disperser les biofilms. En 2010, un nouveau locus de gènes, indispensable pour la production de biofilm, a été décrit (Tao *et al.*, 2010). C'est le locus *xagABC* codant un système glycosyltransférase associé avec la biosynthèse de polysaccharides. La délétion de *xagABC* affecte la production d'EPS et réduit la résistance au stress oxydatif (Tao *et al.*, 2010). Les EPS constituent de 50 à 90 % des matières organiques composant un biofilm (Donlan, 2002). La formation et le maintien de l'architecture en biofilm est dépendante de la production d'EPS (Danese *et al.*, 2000). Le confinement créé par les EPS autour des bactéries agrégées en biofilm et le maintien des échanges entre les bactéries assurent la résistance aux stress et la stabilité des populations bactériennes associées à ces biofilms. Etant protégées contre les différents stress qu'elles rencontrent, les populations bactériennes agrégées en biofilm jouent un rôle très important dans la colonisation de l'hôte et dans le développement de la maladie (Costerton *et al.*, 1987).

3.5. Système de sécrétion de type III et effecteurs de type III, déterminants de la multiplication des bactéries phytopathogènes sur leur hôte

Les bactéries interagissent avec leur environnement notamment grâce à leurs systèmes de sécrétion. Jusqu'à présent, huit types de systèmes de sécrétion ont été décrits (figure 1.30) (Desvaux *et al.*, 2009). Le système de sécrétion de type III (SST3) est au cœur des interactions entre les bactéries et leurs hôtes eucaryotes (végétaux ou animaux). Chez les bactéries pathogènes d'animaux, le SST3 est une aiguille (figure 1.31). Le SST3 des bactéries pathogènes de plantes est équipé d'un long pilus flexible (Troisfontaines et Cornelis, 2005; Büttner et He, 2009). Le SST3 est une nanomachine capable de traverser la membrane d'une cellule hôte eucaryote afin d'injecter des effecteurs de type III (ET3 pour 'Effecteur de Type III') aux activités biochimiques diverses et variées (Cornelis, 2006; Tseng *et al.*, 2009) pouvant moduler

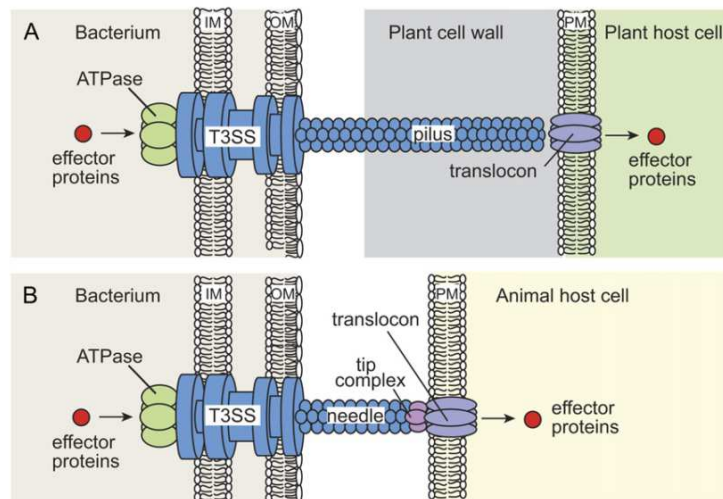


Figure 1.31 : Représentation schématique du système de sécrétion de type III des bactéries pathogènes des plantes (A) et celui des bactéries pathogènes des animaux (B) (d'après Büttner et He, 2009).

la fonction de molécules essentielles à l'hôte (Mudgett, 2005). Il semblerait que le SST3 et le flagelle aient une origine commune (Galán *et al.*, 2014). Les structures des SST3 et du système flagellaire sont effectivement très similaires chez de nombreuses bactéries (figure 1.24). Les similarités de séquences protéiques peuvent également être élevées (Troisfontaines et Cornelis, 2005; Diepold et Wagner, 2014). Le SST3 des bactéries phytopathogènes est codé par le cluster *hrp/hrc* (*hypersensitive response and pathogenicity/hrp conserved*) (Bogdanove *et al.*, 1996; Alfano et Collmer, 2004). Ce SST3 est retrouvé chez les bactéries phytopathogènes à gram négatif (Preston *et al.*, 2005), sauf *Agrobacterium tumefaciens*, *X. albilineans* et *Xylella fastidiosa* (Büttner et Bonas, 2010). Des mutants dans les gènes *hrp* sont associés à la perte de la virulence sur plantes sensibles et de la réaction hypersensible (HR) chez les plantes résistantes (Lindgren, 1997; Büttner et Bonas, 2010). Bien que le jeu de gènes codant la machine du SST3 soit très conservé, le set de ET3 est très variable d'une souche à l'autre (Troisfontaines et Cornelis, 2005). Chez les *Xanthomonas*, les répertoires des ET3 corrélaient avec le regroupement des souches en pathovars. Cela illustre leur rôle dans la spécificité d'hôte (Hajri *et al.*, 2009). En condition d'infection, le SST3 est exprimé et régulé par les masters régulateurs HrpG et HrpX (Guo *et al.*, 2011). HrpG induit l'expression de *hrpX* (Wengelnik *et al.*, 1996) et induit aussi l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la dégradation de la paroi cellulaire, l'attachement, la production de phytohormones et des transporteurs TonB-dépendants (TBDT) (Valls *et al.*, 2006; Blanvillain *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2011). La protéine HrpX induit l'expression des gènes *hrp* et *hrc* (Wengelnik *et al.*, 1996; Koebnik *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009).

Les ET3 sont classés en fonction de leur mode d'action (Mudgett, 2005). Certains ET3 comme AvrPtoB de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) agissent en tant que suppresseur de la mort cellulaire programmée (HR) (Alfano et Collmer, 2004). *Pst* peut aussi activer la voie JA en sécrétant dans la cellule végétale de la coronatine (COR). Une telle activation a habituellement lieu lors de blessures provoquées par l'action des herbivores ou insectes. L'activation de cette voie induit une répression de la voie SA par l'action de JA/COI1 (CORonative Insensitive 1). La répression de la voie SA augmente la sensibilité aux attaques bactériennes (Ellis *et al.*, 2002; Glazebrook *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2003; Glazebrook, 2005; Yi *et al.*, 2014). D'autres, comme YopJ et XopD (SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) protéases) (Kim *et al.*, 2013), YopT et AvrRpt2 (Cystéines protéases) (Niño *et al.*, 2014), HopPtoD2 (Protéine phosphatase) (Espinosa *et al.*, 2003), sont des ET3 ayant des activités biochimiques sur des cibles de l'hôte (Mudgett, 2005). Certains ET3 comme AvrPto inhibent la régénération de la paroi cellulaire et le dépôt de callose (Hauck *et al.*, 2003). D'autres ET3

sont des activateurs de transcription. Ce sont les TALE (Transcriptionnal Activator-Like Effectors) (Mak *et al.*, 2013). Ces effecteurs activent l'expression de gènes cibles de la plante tels que des gènes impliqués dans le transport de sucre comme OsSWEET, d'autres impliqués dans la sensibilité ou la défense des plantes (Kay et Bonas, 2009; White *et al.*, 2009; Bogdanove *et al.*, 2010; Scholze et Boch, 2011; Verdier *et al.*, 2012; Mak *et al.*, 2013). Le premier TALE identifié fut AvrBs3 de *Xanthomonas euvesicatoria* (anciennement *X. campestris* pv. *vesicatoria*). AvrBs3 induit l'hypertrophie des cellules de mésophylle du poivron (Bonas *et al.*, 1989; Marois *et al.*, 2002).

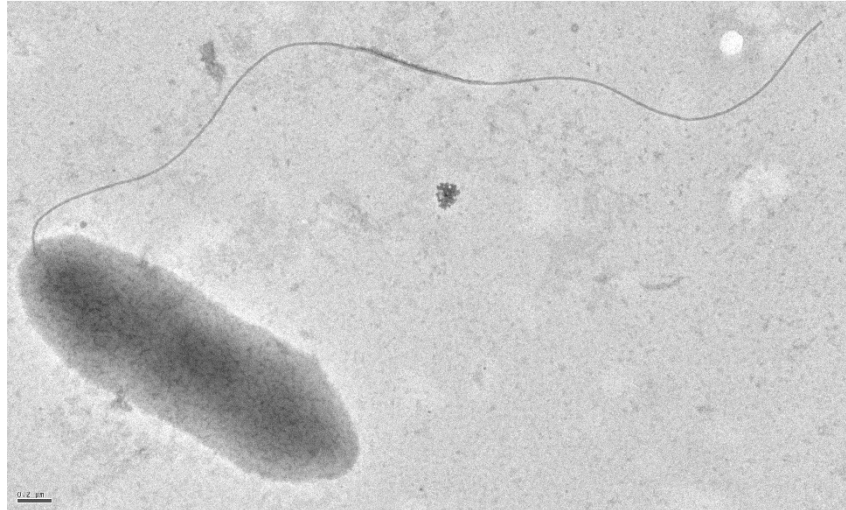


Figure 1.32 : Observation au microscope électronique à transmission du flagelle polaire de la souche CFBP 6996 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Barre d'échelle : 200 nm (copyright INRA, photographie SCIAM, Angers.).

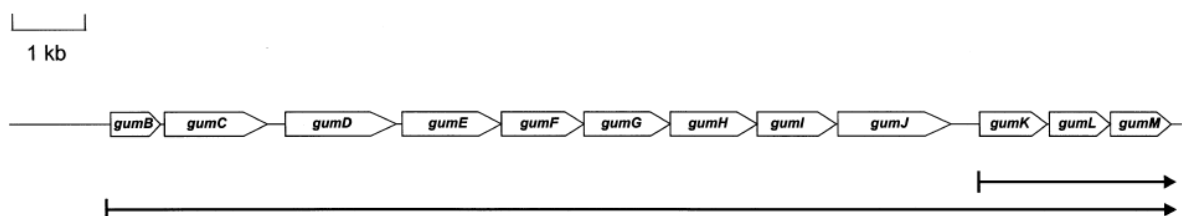


Figure 1.33 : Carte génétique de l'opéron *gum* de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* montrant l'organisation des gènes (d'après Becker *et al.*, 1998).

4. Bactéries du genre *Xanthomonas*, modèles de l'étude

4.1. Caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques

Les bactéries du genre *Xanthomonas* appartiennent à la classe des γ -protéobactéries, à l'ordre des *Xanthomonadales* et à la famille des *Xanthomonadaceae*. Les *Xanthomonas* sont des bacilles à Gram négatif. Elles mesurent de 0,2 à 0,6 μm de large et de 0,8 à 2,9 μm de long. Elles sont généralement seules, par paires, ou occasionnellement en chaînette (Bergey *et al.*, 1923; Swings et Civerolo, 1993; Swings *et al.*, 1993). Ces bactéries sont habituellement pourvues d'un seul flagelle polaire (figure 1.32) leur conférant une mobilité par nage en milieu liquide ou semi-liquide.

Les *Xanthomonas* ne produisent pas de spores, ont un métabolisme respiratoire aérobie strict, sont catalase positive, oxydase négative ou faiblement positive, uréase négative et indole négative. Elles n'accumulent pas de poly- β -hydroxybutyrate, ne réduisent pas les nitrates et ne dénitrifient pas (Lepoivre, 2003; Saddler et Bradbury, 2005). Elles sont riches en acides gras et les lipides comptent pour 20 % du poids de la bactérie. Trois acides gras, 11:0 iso, 11:0 iso 3OH et 13:0 iso 3OH, sont spécifiques du genre *Xanthomonas* (Yang *et al.*, 1993). En grec, le terme « xantho » signifie « jaune ». Sur milieux standards, la plupart des *Xanthomonas* forment des colonies jaunes, convexes, rondes et butyreuses ayant une croissance optimale comprise entre 25 et 30°C (Bradbury, 1984; Saddler et Bradbury, 2005).

Lors des phases exponentielles et stationnaires de croissance, elles produisent un exopolysaccharide (EPS) caractéristique, le xanthane (Büttner et Bonas, 2010). Sur les milieux de culture riche en sucre, cet EPS confère à la colonie un aspect muqueux et est associé à la protection des cellules bactériennes contre les stress environnementaux tels que les rayonnements UV, le froid et la dessiccation (Dunger *et al.*, 2007). Chez *X. campestris* pv. *campestris*, la production de xanthane est assurée par le cluster *gum*. Ce cluster est constitué de 12 gènes (de *gumB* à *gumM*) (figure 1.33) codant des protéines contrôlant l'assemblage des unités pentasaccharidiques, le transfert des constituants non-glycosidiques, la polymérisation et l'exportation du xanthane (Becker *et al.*, 1998; Crossman et Dow, 2004). La production de xanthane est régulée par le cluster *rpf* pour « regulation of pathogenicity factors ». Ce cluster est constitué de neuf gènes (de *rpfA* à *rpfI*). Les protéines RpfC et RpfG forment respectivement

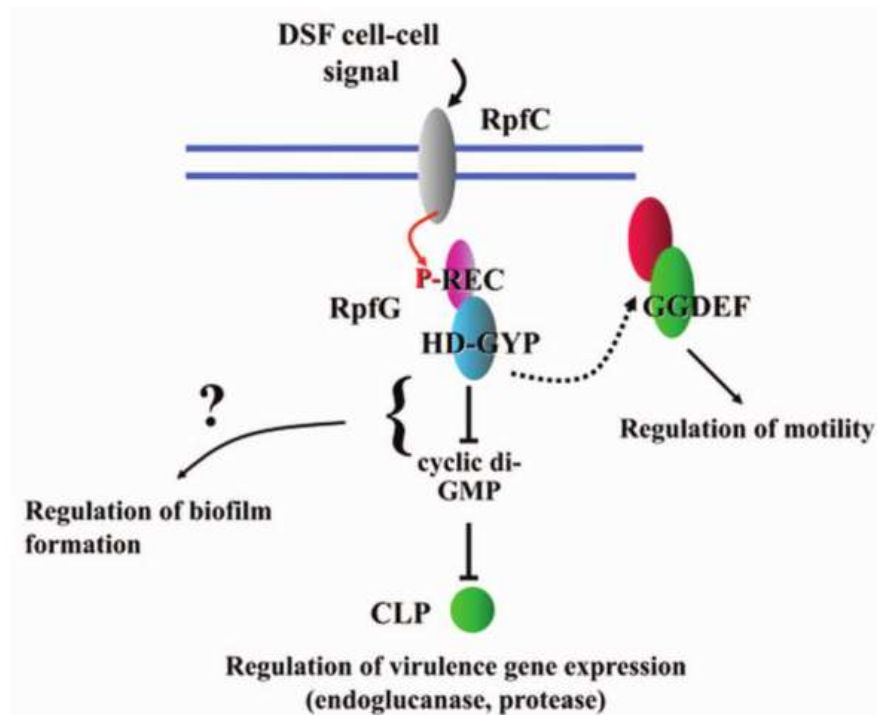


Figure 1.34 : Modèle des rôles respectifs de RpfC, RpfG dans la détection d'une molécule de signalisation diffusible (Diffusible Signal Factor, DSF) et dans la régulation de fonctions cellulaires impliquées dans le pouvoir pathogène des bactéries (d'après Ryan et Dow, 2010).

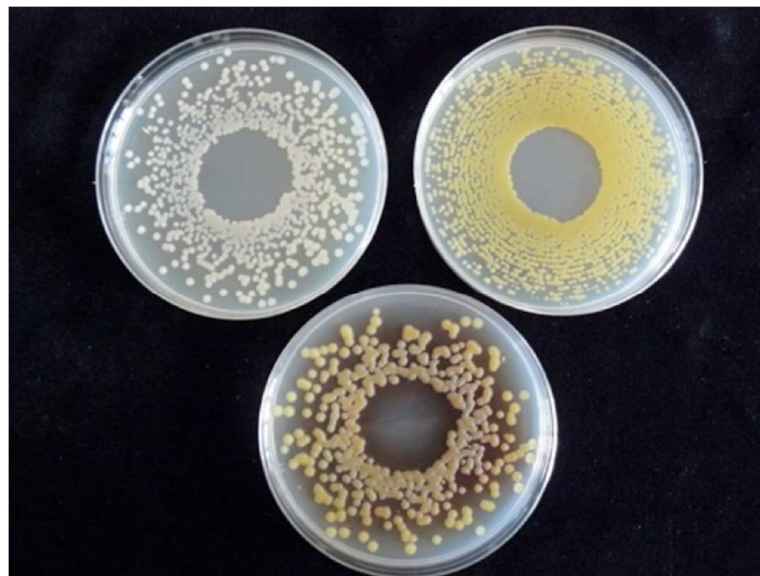


Figure 1.35 : Pigmentation différentielle des colonies bactériennes du genre *Xanthomonas* sur un milieu gélosé. A gauche, des colonies blanches de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* ne produisant pas de xanthomonadine ; à droite, des colonies jaunes de *X. campestris* pv. *campestris* produisant de la xanthomonadine ; en bas, des colonies de *X. fuscans* subsp. *fuscans* produisant de la xanthomonadine et un pigment brun diffusible, appelé *fuscans* (photographie INRA).

les domaines senseur et régulateur d'un système de transduction du signal à deux composantes (figure 1.34). Le domaine senseur de RpfC détecte le signal DSF (acide cis-11-méthyl-2-dodecenoïque). Cette détection conduit à l'autophosphorylation de RpfC, ce qui provoque la phosphorylation du régulateur. La phosphorylation de RpfG va non seulement induire les gènes du cluster *gum* pour la biosynthèse d'EPS mais également des gènes de virulence. La mutation de gènes *rpf* inhibe la biosynthèse d'exoenzymes comme des enzymes de dépolymérisation des parois cellulaires végétales (carboxyl-méthylcellulase, protéase, endo- β -1,4-mannanase et pectate lyase) et de xanthan (Crossman et Dow, 2004; He *et al.*, 2006; Thowthampitak *et al.*, 2008; Ryan et Dow, 2010). Par contre, RpfC inhibe les gènes *rpfF* et *rpfB* qui sont, quant à eux, impliqués dans la biosynthèse de DSF (Slater *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2006, 2011; Ryan et Dow, 2008; An *et al.*, 2013; O'Connell *et al.*, 2013).

Suite à la production d'un pigment caroténoïde photoprotecteur, la xanthomonadine, la majorité des *Xanthomonas* forment des colonies jaunes (figure 1.35). Ce pigment inhibe la peroxydation des lipides habituellement provoquée par la lumière (Rajagopal *et al.*, 1997). La xanthomonadine participerait ainsi à la survie épiphyte de certaines bactéries (Poplawsky *et al.*, 2000). En effet, un mutant de *X. juglandis* déficient en xanthomonadine est moins résistant que le parent sauvage à des stress environnementaux (Jenkins et Starr, 1982). Cependant, certains pathovars aux compétences épiphytes connues tels que *X. axonopodis* pv. *manihotis* ne produisent pas de xanthomonadine (Kemp *et al.*, 2004; Büttner et Bonas, 2010) ; les colonies sont alors blanches (figure 1.35).

4.2. Caractéristiques génomiques

Actuellement, plus de 200 génomes de *Xanthomonas* ont été séquencés. Le génome des bactéries du genre *Xanthomonas* est généralement composé d'un chromosome circulaire (Ryan *et al.*, 2011). L'analyse des 80 génomes disponibles publiquement (base de données du NCBI en juillet 2014) montre que la taille moyenne du génome des *Xanthomonas* est de 4,92 Mb. La taille des génomes varie de 3,70 à 5,53 Mb. Les génomes les plus petits sont ceux de la souche de *Xanthomonas* sp. NCPPB1131 et de la souche GPE PC73 de *X. albilineans* qui ne mesurent respectivement que 3,70 Mb et 3,85 Mb. Le génome séquencé la souche NCPPB1131 a un nombre de contigs très élevé (3224 contigs) ce qui peut faire douter de la taille exacte de ce génome contrairement à la séquence du génome de la souche GPE PC73 qui est complète et

assemblée (Pieretti *et al.*, 2009). Le nombre moyen de gènes prédits dans les génomes des *Xanthomonas* est de 4147 avec un minimum de 3208 pour la souche GPE PC73 et 5027 pour la souche ATCC19865 de *X. gardneri*. La taille moyenne des gènes est de 1154 pb. Le pourcentage en GC moyen du génome des *Xanthomonas* est de 64,8 % avec un minimum de 61,8 % pour la souche NCPPB4381 de *X. campestris* pv. *musacearum* et de 69 % pour la souche NCPPB4393 de *X. sacchari*. Un nombre variable, mais généralement faible, de plasmides complète le génome de certaines souches (Meyer et Bogdanove, 2009). Sur 80 génomes disponibles, 13 sont complètement assemblés dont quatre avec des plasmides. Les génomes des souches GPE PC73 de *X. alibilineans*, Aw12879 de *X. citri* subsp. *citri*, 306 de *X. axonopodis* pv. *citri*, et 85-10 de *X. campestris* pv. *vesicatoria* ont respectivement trois, deux, deux et quatre plasmides.

4.3. Phylogénie et taxonomie des *Xanthomonas*

C'est en 1883 qu'une maladie provoquée par une bactérie du genre *Xanthomonas* a été décrite pour la première fois (Wakker, 1883). Depuis 1883, la classification et la taxonomie des *Xanthomonas* ont beaucoup évolué. A l'époque, cette bactérie a été nommée *Bacterium hyacinthi*. Elle provoquait une maladie sur jacinthes (Wakker, 1883). Puis, toutes les bactéries phytopathogènes ont été classées dans la tribu des *Erwinieae* (Bergey *et al.*, 1923). Cette tribu a été subdivisée en deux genres, les genres *Erwinia* et *Phytoponas*. Les *Xanthomonas* faisaient partie des *Phytoponas* (Bergey *et al.*, 1923). C'est en 1939, que le genre *Xanthomonas* a été créé (Dowson, 1939). Les bactéries étaient alors classées en prenant en compte des caractéristiques phénotypiques, morphologiques, biochimiques et/ou sérologiques. Ainsi les *Xanthomonas* étaient-ils subdivisés en 5 espèces dont l'espèce type *Xanthomonas campestris* (Young *et al.*, 1978; Hayward, 1993). Le terme pathovar a été défini par Young et collègues (1978) pour grouper les souches selon leur capacité à provoquer un type de symptômes sur une gamme d'hôtes donnée. C'est grâce à la technique d'hybridation ADN-ADN que la taxonomie du genre *Xanthomonas* a été redéfinie en 1995. En effet, 20 espèces ont alors été décrites dans le genre *Xanthomonas* (figure 1.36) (Vauterin *et al.*, 1995, 2000; Vauterin et Swings, 1997). Les contours de l'espèce *X. campestris* qui comptait plus de 100 pathovars avant cette étude ont été redessinés. *Sensu stricto* depuis ces travaux, les souches regroupées au sein de l'espèce *X. campestris* sont toutes pathogènes de *Brassicaceae*. Toutefois, cette étude n'ayant pu être

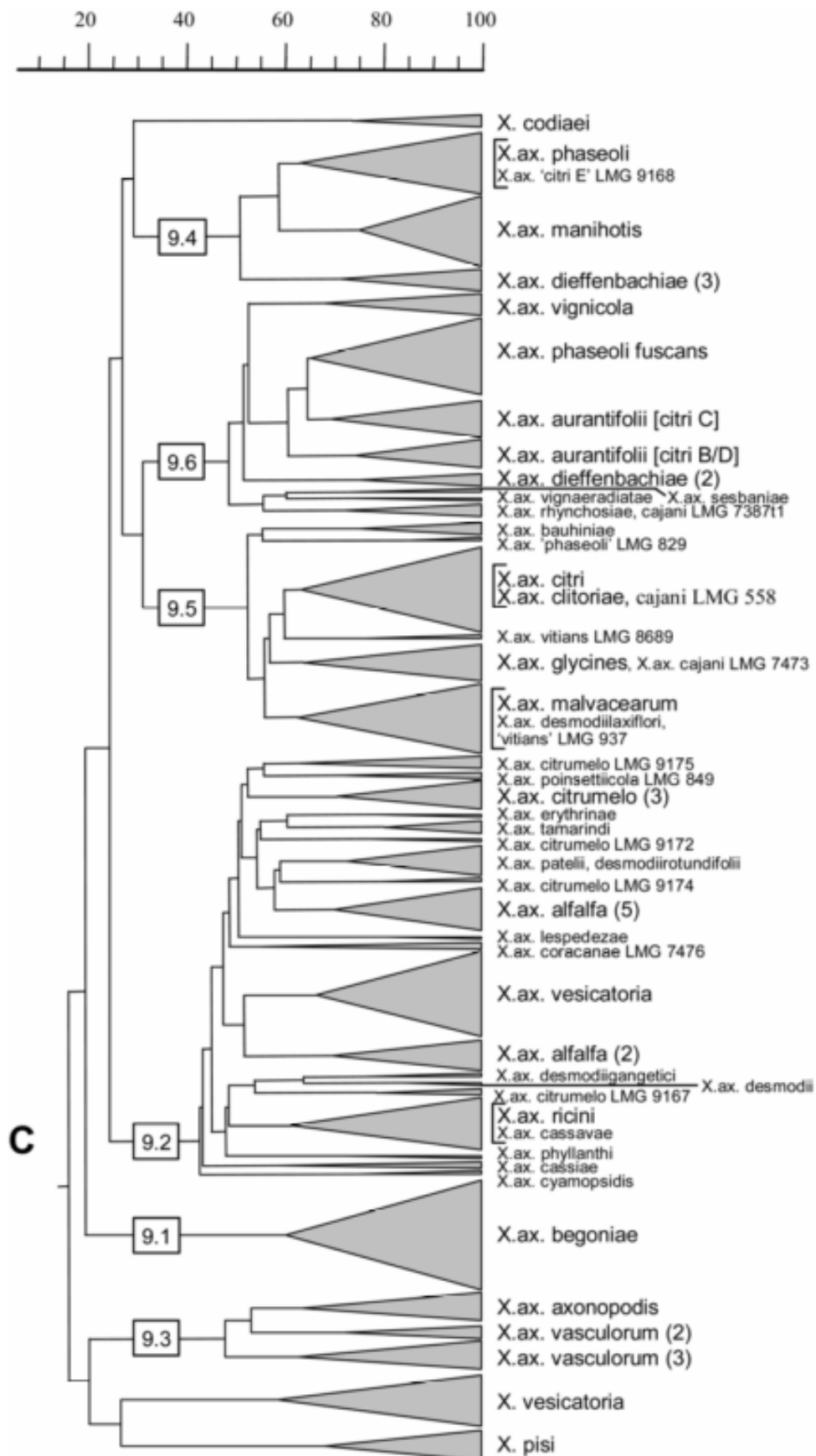


Figure 1.37 : Arbre des groupes (9.1 à 9.6) de *Xanthomonas axonopodis* (cluster C) définis par Rademaker et collègues en 2005. Les chiffres entre parenthèse indiquent le nombre de souches utilisées.

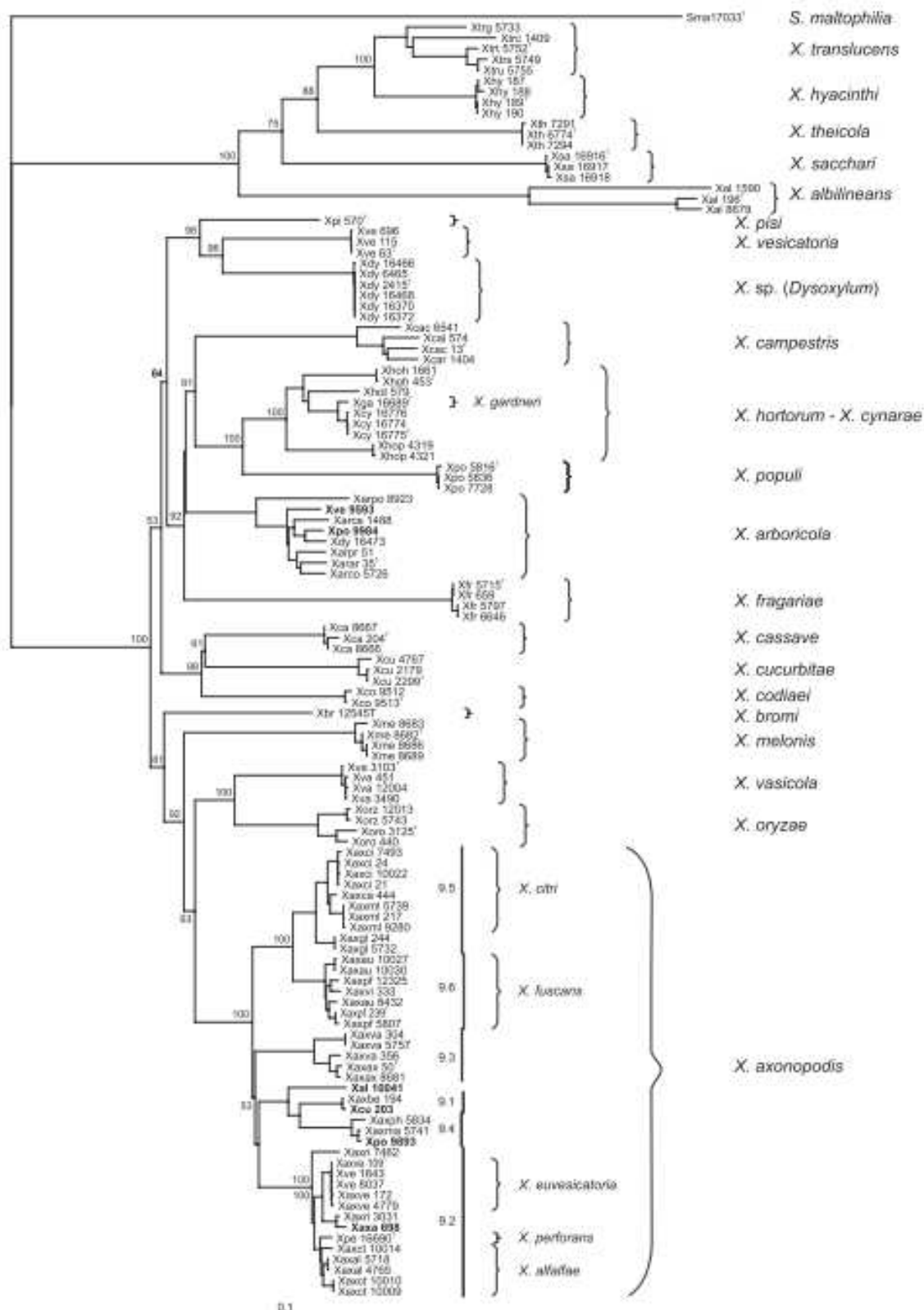


Figure 1.38 : Arbre en Neighbor-Joining construit à partir des données concaténées des séquences partielles de quatre gènes de ménage (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB* et *rpoD*). L'analyse a été réalisée sur 119 souches représentant la diversité des bactéries du genre *Xanthomonas*. Les chiffres 9.1 à 9.6 correspondent aux groupes définis par Rademaker au sein de l'espèce *X. axonopodis* (d'après Young *et al.*, 2008).

totalement exhaustive une soixantaine de pathovars auparavant placés dans *X. campestris* n'ont pu être repositionnés phylogénétiquement et leur nomenclature n'a pas été mise à jour ce qui crée une certaine confusion, puisque des souches pathogènes sur des plantes très diverses peuvent encore être dénommées *X. campestris*. Grâce à des méthodes d'empreintes moléculaires basées sur un typage d'éléments répétés (BOX (conserved repetitive sequences), ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) et REP (repetitive extragenic palindromic)), Rademaker et collègues (2005) ont confirmé les résultats obtenus avec l'hybridation ADN-ADN (figure 1.36) par Vauterin et collègues (1995). Au sein du groupe 9, correspondant à l'espèce *X. axonopodis*, six groupes ont été défini (de 9.1 à 9.6) (figure 1.37) (Rademaker *et al.*, 2005). Par la suite, la technique MLSA (MultiLocus Sequence Analysis) a été développée. Cette technique est basée sur l'analyse phylogénétique de séquences de gènes de ménage (gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme de base des bactéries) (Maiden *et al.*, 1998; Gevers *et al.*, 2005; Maiden, 2006; Fargier *et al.*, 2011; Jacques *et al.*, 2012). Une analyse MLSA basée sur quatre gènes de ménage (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB* et *rpoD*) a été réalisée sur une collection de 119 souches représentatives des différentes espèces du genre *Xanthomonas* (figure 1.38) (Young *et al.*, 2008). Cette étude suggère que *X. gardneri* et *X. cynarae* pourraient être synonymes. Rodriguez-R et collègues (2012) se basent sur l'analyse de données génomiques pour faire la phylogénie des bactéries du genre *Xanthomonas*. Basée sur un alignement des groupes d'orthologues, cette phylogénie montre, par exemple, que les souches de l'espèce *X. fuscans* pourraient être classées dans l'espèce *X. citri* qui rassemblerait alors les groupes 9.5 et 9.6 de Rademaker. C'est aussi ce qu'avaient conclu Young et collègues (2008) et Ah-You et collègues (2009).

4.4. Hôtes et maladies

Les bactéries du genre *Xanthomonas* sont des bactéries associées aux plantes. La plupart d'entre elles sont connues comme étant phytopathogènes. Les hôtes des *Xanthomonas* ont souvent un intérêt économique majeur (figure 1.39) (da Silva *et al.*, 2002; Thieme *et al.*, 2005; Jacques *et al.*, 2005; Ah-You *et al.*, 2009; Pruvost *et al.*, 2009; Carter *et al.*, 2010; Kimbrel *et al.*, 2011; Pieretti *et al.*, 2012; Rai *et al.*, 2012; Jalan *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013). En effet, plus de 400 espèces de plantes (124 monocotylédones et 268 dicotylédones) dont le riz, la banane, les haricots et les agrumes sont hôtes des *Xanthomonas* (Ryan *et al.*, 2011). Parmi les

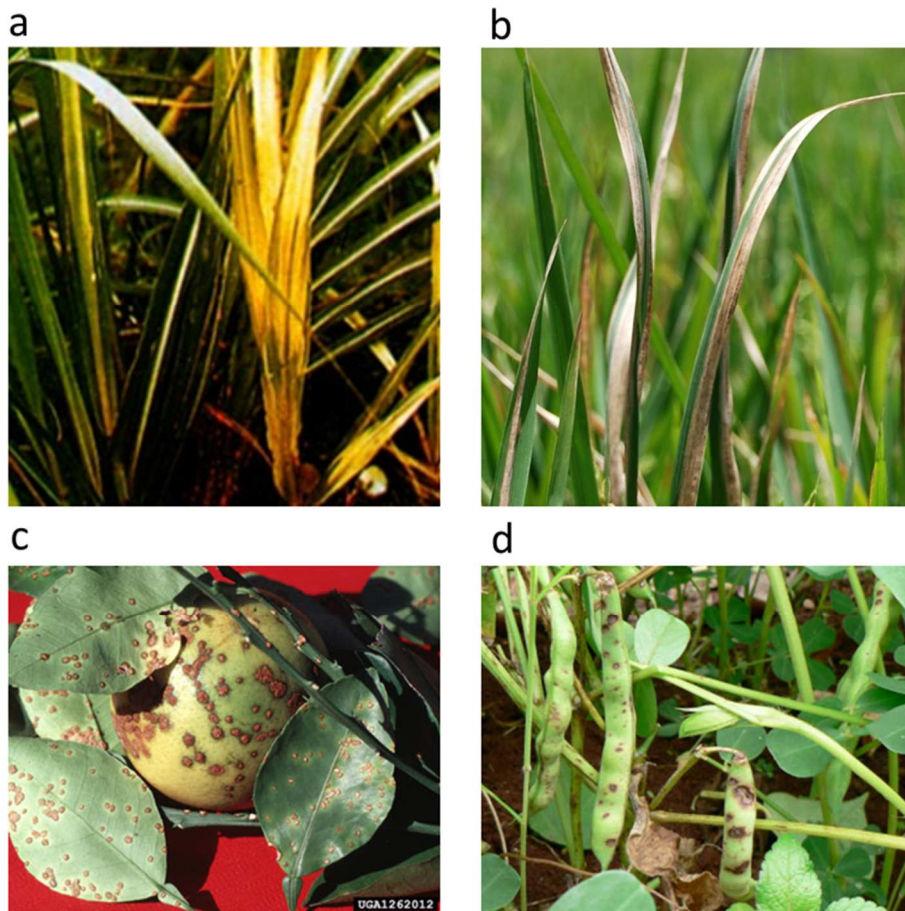


Figure 1.39 : Photographies de symptômes provoqués par divers *Xanthomonas* sur plantes. (a) Echaudure des feuilles de canne à sucre provoquée par *X. albilineans* ; (b) maladie du flétrissement bactérien du riz provoquée par *X. oryzae* pv. *oryzae* ; (c) chancre bactérien des agrumes provoquée par *X. citri* subsp. *citri* ; (d) grasse commune du haricot provoquée par *X. axonopodis* pv. *phaseoli* ou *X. fuscans* subsp. *fuscans* (photographie INRA).

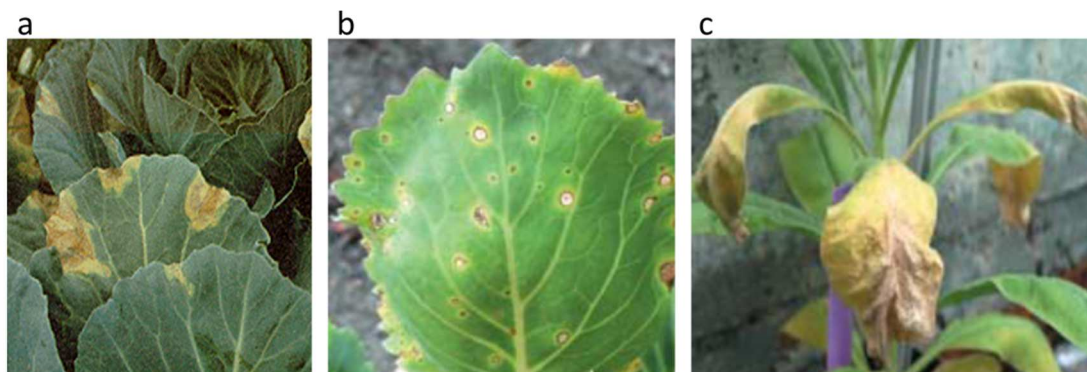


Figure 1.40 : Photographies de symptômes provoqués sur *Brassica* spp. par différents pathovars de *X. campestris*. (a) Nervation noire des *Brassicaceae* provoquée par le pathovar *campestris* ; (b) Maladie des taches foliaires des *Brassicaceae* provoquée par le pathovar *raphani* ; (c) Nervation noire des *Brassicaceae* provoquée par le pathovar *incanae* (d'après Fargier *et al.*, 2007).

monocotylédones, les hôtes sont répartis dans au moins 11 familles comprenant au moins 70 genres. Parmi les dicotylédones, les hôtes sont répartis dans au moins 57 familles comprenant au moins 170 genres (Hayward, 1993). Il existe aussi des bactéries du genre *Xanthomonas* qui ne sont pas pathogènes des plantes. Elles sont dans ce cas connues comme étant associées aux plantes (Vauterin *et al.*, 1996).

4.4.1. *Xanthomonas campestris*, focus sur *X. campestris* pv. *campestris* et leurs hôtes les *Brassicaceae*

Trois pathovars ont été décrits dans l'espèce *X. campestris* (Fargier et Manceau, 2007) : les pathovars *campestris* (*Xcc*), *raphani* (*Xcr*) et *incanae* (*Xci*) (figure 1.40). Ces trois pathovars provoquent respectivement des maladies appelées la nervation noire des *Brassicaceae*, la maladie des tâches foliaires des *Brassicaceae* et le dépérissement des giroflées. *Xcc* et *Xci* sont des bactéries vasculaires (Kendrick et Baker, 1942; Williams, 1980) tandis que *Xcr* colonise le parenchyme (McCulloch, 1929; White, 1930). Les souches de *Xcc* ont une grande diversité génétique (Fargier *et al.*, 2011; Guy *et al.*, 2013). Sur la base de réactions différentielles sur *Brassicaceae*, neuf races ont été identifiées chez *Xcc* (Fargier et Manceau, 2007) et trois chez *Xcr* (Vicente *et al.*, 2006).

4.4.1.1. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Xcc est considérée comme la bactérie nécrotrophe dont l'impact économique est le plus important sur les *Brassicaceae* (Vicente et Holub, 2012). Cette bactérie pénètre dans les tissus de ces plantes en passant par des blessures ou des entrées naturelles (Shigaki *et al.*, 2000) dont principalement, les hydathodes (Hugouvieux *et al.*, 1998). Quand l'humidité est élevée, par exemple très tôt le matin, des gouttes de guttation sont visibles à l'extrémité des hydathodes. Ce phénomène est dû à une humidité élevée, une forte pression racinaire combinée à un faible niveau d'évapotranspiration (Ruissen et Gielink, 1994). Lorsque l'hygrométrie diminue, les gouttes de guttation sont alors réabsorbées. Par conséquent, les bactéries qui se trouvent dans ces gouttelettes sont absorbées dans les vaisseaux du xylème. Par la suite, *Xcc* se disperse dans les vaisseaux du xylème et provoque la nervation noire des *Brassicaceae* (Dugé de Bernonville *et al.*, 2014). Ces auteurs montrent que lorsque *Xcc* est cultivé dans un extrait de sève brute, des gènes impliqués dans l'adhésion et la mobilité par « twitching » sont induits, alors que ce n'est pas le cas dans un milieu minimum. Cela indique que certaines fonctions comme le transport,



Figure 1.41 : Symptômes de la nervation noire des *Brassicaceae* sur feuille de chou provoqués par *X. campestris* pv. *campestris*. Nervation noire et vascularisation de *Xcc* (a) ; lésion en « V » illustrant la pénétration de *Xcc* par les hydathodes sur feuille et sur chou entier (b et c), (photographie INRA, Ontario).

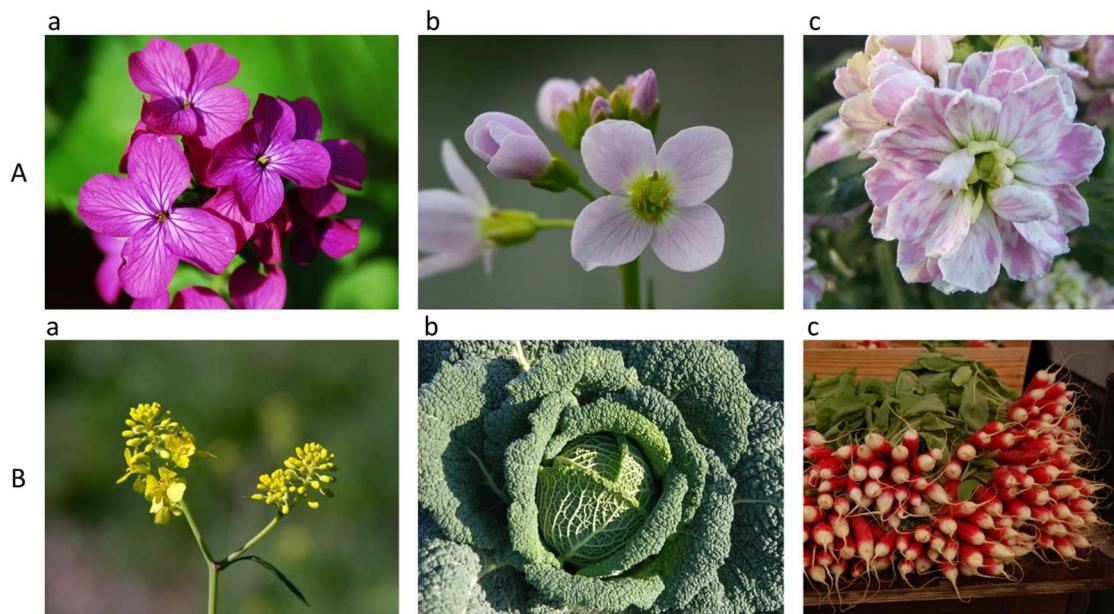


Figure 1.42 : *Brassicaceae* d'intérêt économique. (A) Quelques *Brassicaceae* d'ornement : (a) Monnaie-du-Pape (*Lunaria annua*), (b) Cardamine des près (*Cardamine pratensis*), (c) Giroflée (*Matthiola incana*). (B) Quelques *Brassicaceae* cultivées : (a) Roquette (*Eruca sativa*), (b) Chou pommé (*Brassica oleracea*), (c) Radis (*Raphanus sativus*).



Figure 1.43 : Photographies d'*Arabidopsis thaliana*. (a) Plante entière au stade floral ; (b) fleurs d'*Arabidopsis thaliana* (photographie : Arabidopsis Biological Resource Center).

la mobilité et la formation de biofilms ont une part très importante dans la colonisation de la plante hôte par *Xcc*. La nervation noire des *Brassicaceae* est favorisée par une température et une humidité élevée. Les symptômes induits par cette bactérie vont des chloroses à des lésions nécrotiques commençant à la marge de la feuille avec un noircissement des tissus vasculaires. Les lésions jaunâtres symétriques en forme de « V » tout au long de la marge des feuilles et dirigées vers l'intérieur de la feuille sont caractéristiques de cette maladie (figure 1.41) (Kamoun *et al.*, 1992; Hugouvieux *et al.*, 1998; Alvarez, 2001). Les lésions jaunâtres deviennent brunes et nécrosent au fur et à mesure que les bactéries progressent dans le système vasculaire et le parenchyme (Fargier et Manceau, 2007). La dégradation des parois végétales est due à la présence d'une grande quantité d'enzymes pouvant notamment dégrader la pectine (pectates lyases, pectines lyases, pectines méthylestérases, polygacturonases), la cellulose (cellulases comme les endoglucanases, cellobiosidases et β -glucosidases) ou l'hémicellulose comme le xylane (xylanases et xylosidases) (Wei *et al.*, 2007; Déjean *et al.*, 2013). Des enzymes extracellulaires comme des protéases, des endoglucanases et des amylases contribuent collectivement à la virulence de *Xcc* (Gough *et al.*, 1990; Tang *et al.*, 1990; Chan et Goodwin, 1999; Wei *et al.*, 2007). Il a aussi été montré que cette bactérie était capable de contrôler l'ouverture des stomates. Ce contrôle est dû à la sécrétion de DSF (Gudesblat *et al.*, 2009). Cette bactérie peut se transmettre aux et par les semences de ses plantes hôtes (Schaad et Dianese, 1981; Franken, 1992; Lema *et al.*, 2012). *Xcc* est capable de survivre sur des résidus de choux jusqu'au moins 507 jours après inoculation (Schultz et Gabrielson, 1986). La culture de choux dans des zones où il y a déjà des résidus de choux est donc à éviter pour limiter les risques de contamination d'une culture à l'autre. La dispersion de *Xcc* dans l'environnement est favorisée par les insectes (Shelton et Hunter, 1985), l'irrigation (Grimm et Vogelsanger, 1990), le vent (Kuan *et al.*, 1986) et la pluie (Williams, 1980). Néanmoins, les semences contaminées restent la source majeure d'inoculum. La lutte prophylactique contre la nervation noire des *Brassicaceae* passe alors par le contrôle des lots de semences contaminées par *Xcc*. Cette méthode de lutte doit être prolongée au champ par la mise en place de bonnes pratiques culturales et l'optimisation de ces pratiques.

4.4.1.2. *Brassicaceae*

4.4.1.2.1. Généralités

Les *Brassicaceae* (figure 1.42) sont une famille de plantes qui était auparavant appelée les Crucifères. Ce sont des dicotylédones qui appartiennent à l'ordre des *Brassicales*. La famille

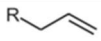


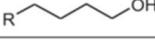
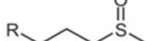



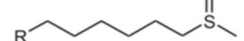

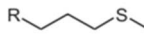
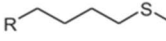
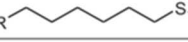


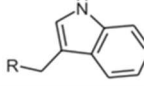
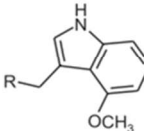
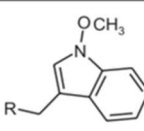
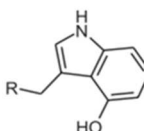
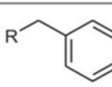
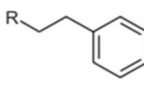
Glucosinolate	Trivial name	Side chain structure
2-Propenyl	Sinigrin	
3-Butenyl	Gluconapin	
3-Hydroxypropyl	–	
4-Hydroxybutyl	–	
3-Methylsulfinylpropyl	Glucoiberin I	
4-Methylsulfinylbutyl	Glucoraphanin	
5-Methylsulfinylpentyl	Glucoalyssin	
6-Methylsulfinylhexyl	Glucohesperin	
7-Methylsulfinylheptyl	Glucoibarin	
8-Methylsulfinyloctyl	Glucohirsutin	
3-Methylthiopropyl	Glucoibervirin	
4-Methylthiobutyl	Glucoerucin	
6-Methylthiohexyl	Glucosquerellin	
7-Methylthioheptyl	–	
8-Methylthiooctyl	–	
Indol-3-ylmethyl	Glucobrassicin	
4-Methoxyindol-3-ylmethyl	4-Methoxygluco-brassicin	
1-Methoxyindol-3-ylmethyl	Neoglucobrassicin	
4-Hydroxyindol-3-ylmethyl	4-Hydroxygluco-brassicin	
Benzyl	Glucotropacolin	
2-Phenylethyl	Gluconastrutiin	

Figure 1.44 : Chaîne latérale de divers glucosinolates. R représente la structure cœur conservée chez tous les glucosinolates (figure 45) (d'après Radojic Redovnikovic *et al.*, 2008).

Brassicaceae regroupe entre 3000 et 4000 espèces réparties en 350 genres environ. Il y a 25 tribus dans cette famille. Parmi les *Brassicaceae*, beaucoup d'espèces sont d'intérêt économique : dans l'alimentation (huile, fourrage et condiment) et comme espèces ornementales. Par exemple, la tribu *Brassicae* contient les genres *Brassica*, *Raphanus* et *Eruca* (Al-Shehbaz *et al.*, 2006). Ces genres regroupent des espèces comme le colza (*B. napus*), les navets (*B. rapa*), les moutardes, la moutarde noire (*B. nigra*), le chou commun (*B. oleracea*). Cette dernière espèce regroupe notamment le chou-fleur (*B. oleracea* var. *botritis*), le chou pommé (*B. oleracea* var. *capitata*), le chou rave (*B. oleracea* var. *gongylodes*), le chou fourrager (*B. oleracea* var. *acephala*), les choux de Bruxelles (*B. oleracea* var. *gemminifera*) et le brocoli (*B. oleracea* var. *italica*).

4.4.1.2.2. Cas particulier de l'arabette

Arabidopsis thaliana (figure 1.43) est considérée comme une mauvaise herbe appartenant à la famille des *Brassicaceae*. Elle est aussi appelée, dans le langage commun, « Arabette des Dames ». Avec 25 498 gènes prédits, son génome est le plus petit génome végétal connu. C'est la première espèce végétale dont le génome a été séquencée (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). L'arabette est une plante modèle très utilisée par les biologistes. Son statut de plante modèle est notamment dû à la petite taille de son génome, la facilité et la rapidité à la cultiver en laboratoire (cycle court, environ 2 mois lorsque les conditions sont optimales), son côté très prolifique (plusieurs dizaines de milliers de graines par individu). Beaucoup d'études sur les interactions plante-bactérie ont été réalisées sur *A. thaliana* (Dangl et Jones, 2001; Mudgett, 2005; Rong *et al.*, 2010; Roux *et al.*, 2011; Segonzac et Zipfel, 2011). Plusieurs bases de données et ressources génétiques sur l'arabette existent. La base TAIR de Stanford en Californie (The Arabidopsis Information Resource) regroupe et maintient une base de données génétiques et de biologie moléculaire sur cette plante (Huala *et al.*, 2001; Rhee *et al.*, 2003; Lamesch *et al.*, 2012). L'ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center) et le NASC (The European Arabidopsis Stock Centre) sont des centres de ressources biologiques qui fournissent des graines et d'autres ressources biologiques (mutants, lignées cellulaires...) d'*Arabidopsis* et d'autres espèces proches (Scholl *et al.*, 2000; Craigon *et al.*, 2004).

4.4.1.2.3. Les glucosinolates

Les glucosinolates (figure 1.44) font partie des métabolites secondaires typiques des *Brassicaceae*. En effet, plus de 130 glucosinolates différents ont été identifiés chez les *Brassicaceae* (Redovniković *et al.*, 2008). Ils partagent tous une structure cœur, constituée

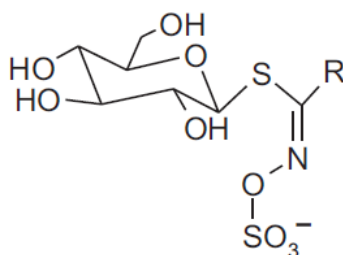


Figure 1.45 : Structure cœur conservée chez tous les glucosinolates. R représente ici les différents acides aminés possibles qui peuvent former un glucosinolate (figure 44) (d'après Radojcic Redovnikovic *et al.*, 2008).

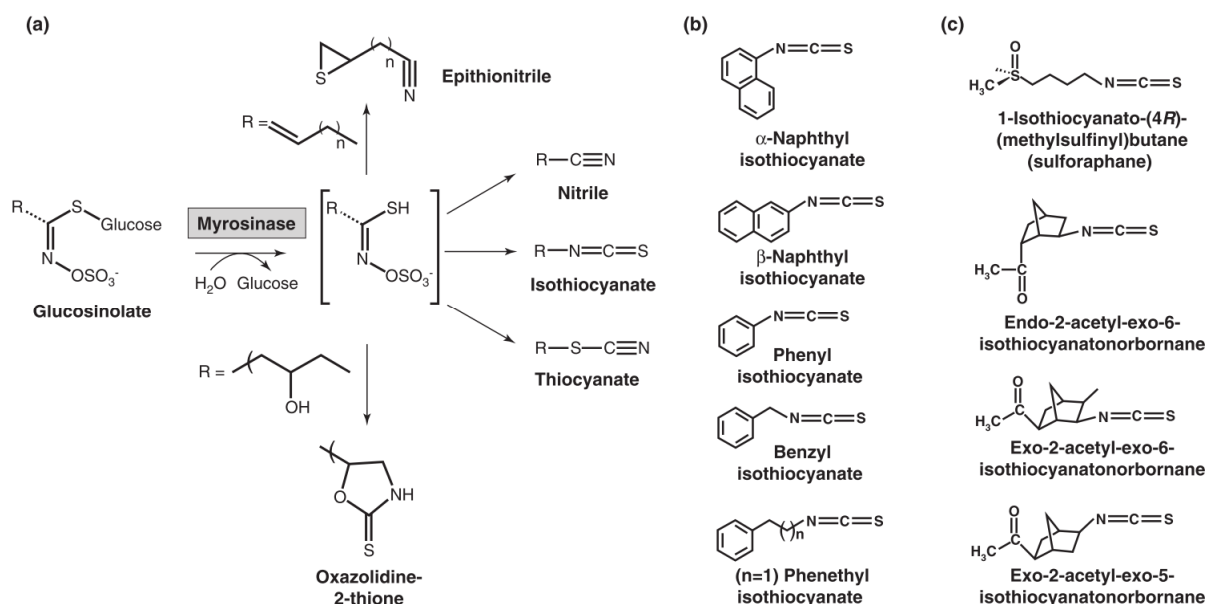


Figure 1.46 : Action de la myrosinase sur les glucosinolates et diversité des produits synthétisés. R représente les différents acides aminés possibles formant les glucosinolates ou leurs produits de dégradation. (a) L'hydrolyse des glucosinolates, catalysée par la myrosinase, donne des aglucones instables et libère du glucose en consommant de l'eau. En fonction des conditions de réaction et de la structure de R, une série de produits peuvent être formés : nitriles, isothiocyanates, thiocyanates, epithionitriles et oxazolidine-2-thiones. (b) Structure chimique des isothiocyanates aromatiques anticancéreux. (c) Structure chimique des isothiocyanates de sulforaphanes d'origine naturelle et de leurs analogues synthétiques norbornyles (d'après Dinkova-Kostova *et al.*, 2012).

d'une partie β -D-thiogluco-side, d'un résidu N-hydroxyimino-sulfate et d'une chaîne (R) dérivée d'acides aminés (figure 1.45) (Bringmann *et al.*, 2005). Sur la base de la structure des différents acides aminés, les glucosinolates sont divisés en trois classes : glucosinolates aliphatiques (dérivés de la méthionine, isoleucine, leucine ou valine), aromatiques (dérivés de phénylalanine et tyrosine) et indoliques (dérivés de la tyrosine) (Velasco et Soengas, 2008).

Les glucosinolates sont dégradés par l'action de la myrosinase, une β -thiogluco-sidase (figure 1.46) (Bridges *et al.*, 2002; Kliebenstein *et al.*, 2005; Halkier et Gershenzon, 2006; Hopkins *et al.*, 2009; Dinkova-Kostova et Kostov, 2012; Abdalsamee *et al.*, 2014; Bell et Wagstaff, 2014; Beran *et al.*, 2014). Chez les *Brassicaceae*, les glucosinolates et leur enzyme de dégradation, la myrosinase, sont dans des compartiments cellulaires différents. Dans le cas d'une blessure, il y a un relargage des produits de dégradation des glucosinolates permettant à la plante de se défendre contre les nuisibles (Bohinc *et al.*, 2012). Ces molécules et leurs produits de dégradation sont aussi en parties responsables du goût et de l'odeur de certaines espèces de *Brassicaceae* comme la sensation piquante de la moutarde (Kim *et al.*, 2002; Li et Kushad, 2004). Leurs produits de dégradation (isothiocyanates volatile, thiocyanates, cyanides organiques, oxazolidinethiones, nitriles, epithionitriles et oxazolidine-2-thiones) ont des propriétés antimicrobiennes (Tierens *et al.*, 2001; Zukalová et Vasak, 2002; Kliebenstein *et al.*, 2005; Aires *et al.*, 2009; Blažević et Mastelić, 2009; Bohinc *et al.*, 2012; Dufour *et al.*, 2012). Ils sont, en général, répulsifs pour les herbivores mais peuvent favoriser l'oviposition de certaines espèces d'insectes spécialistes des plantes contenant des glucosinolates (Redovniković *et al.*, 2008). C'est le cas de deux papillons appelés *Pieris rape* (Pieride de la rave) (Miles *et al.*, 2005) et *Hellula undalis* (tisseuse du chou) (Mewis *et al.*, 2002). Ce sont des métabolites de défense des plantes.

La teneur en glucosinolates des *Brassicaceae* est dépendante de l'espèce, la variété, l'âge, les parties de la plante et des conditions environnementales (Rosa et Rodrigues, 2001; Brown *et al.*, 2003; Bellostas *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2004; Chun *et al.*, 2013). La sinigrine, progoitrine et sinalbine sont à un haut niveau de concentration dans les fleurs. La concentration en glucosinolates décroît des fleurs aux racines (Zrybko *et al.*, 1997; Agneta *et al.*, 2014). Les racines ont donc la concentration la plus basse en glucosinolates. Les tissus les plus jeunes en contiennent plus (Blažević et Mastelić, 2009). Chez *B. oleracea* les glucosinolates majeurs sont la sinigrine, glucobrassicine et glucoiberine. Ils représentent respectivement 35, 29 et 25 % des glucosinolates totaux (Abdel-Farid *et al.*, 2006). De fortes concentrations en sinigrine ont été trouvées chez *B. nigra*, *B. juncea* var. *rugosa* et *B. oleracea* (choux de Bruxelles, choux, chou-fleur et Broccoli chinois). La gluconapine représente 86 % des glucosinolates totaux de *B. rapa*.

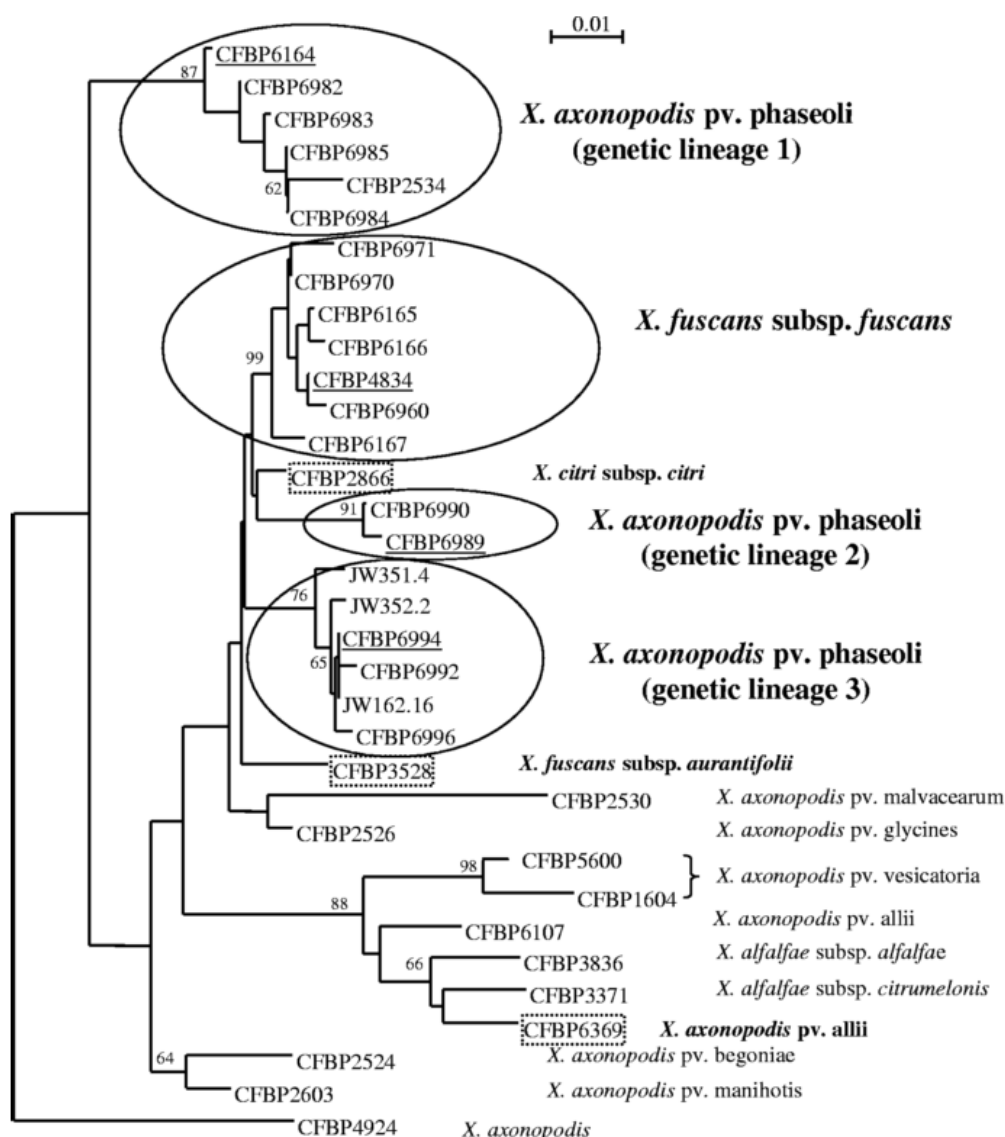


Figure 1.47 : Dendrogramme construit par la méthode du Neighbor-Joining d'empreintes AFLP montrant les relations phylogénétiques entre des souches de *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* et *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et des souches de *Xanthomonas* proches phylogénétiquement (d'après Alavi *et al.*, 2008).

La glucobrassicinapine et la gluconasturtiine sont les autres glucosinolates majeurs de cette espèce (Abdel-Farid *et al.*, 2006). Les glucosinolates s'accumulent lors des blessures provoquées par l'attaque de bioagresseurs (Bohinc *et al.*, 2012), après l'application de métaux lourds (Jahangir *et al.*, 2008) et après traitement avec l'acide salicylique, l'acide jasmonique et le méthyl-jasmonate (Ludwig-Müller *et al.*, 1997; Liang *et al.*, 2006).

4.4.2. *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. fuscans* subsp. *fuscans* et leur hôte *Phaseolus vulgaris*

4.4.2.1. *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et *X. fuscans* subsp. *fuscans*

X. axonopodis pv. *phaseoli* (*Xap*) et *X. fuscans* subsp. *fuscans* (*Xff*) sont les bactéries responsables de la graisse commune du haricot (*Phaseolus vulgaris*) (Vauterin *et al.*, 1995, 2000; Chan et Goodwin, 1999; Jacques *et al.*, 2005; Mahuku *et al.*, 2006; Darrasse *et al.*, 2013). L'agrégation en biofilms permet à ces bactéries de résister aux stress environnementaux et ainsi de coloniser de manière épiphyte et durable leur hôte, le haricot (Jacques *et al.*, 2005). *Xap* et *Xff* colonisent les parenchymes suite à la colonisation des stomates ou par pénétration par les blessures. Elles colonisent également le xylème du haricot et contaminent les graines par voie florale et vasculaire (Darsonval *et al.*, 2008). Les symptômes de la graisse commune du haricot sont des taches huileuses évoluant en nécroses sur les feuilles, les tiges, les gousses et les graines. La lutte contre cette maladie passe principalement par le contrôle des lots de semences de haricots. Des études de diversité génétique ont montré l'existence de quatre lignées génétiques parmi les agents de la graisse commune. Les souches des lignées génétiques GL2, GL3 et *fuscans* sont phylogénétiquement éloignées des souches de la lignée GL1 (figure 1.47) (Alavi *et al.*, 2008; Hajri *et al.*, 2009; Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011). Les lignées GL2, GL3 et *fuscans* sont dans le groupe 9.6 de Rademaker tandis GL1 se positionne dans le groupe 9.4. Autrefois les souches de ces quatre lignées étaient classées dans une même espèce et un même pathovar (*Xap*) (Vauterin *et al.*, 1995). Les souches *fuscans* ont été depuis reclassées dans une nouvelle espèce (*X. fuscans*) mais les souches des lignées GL2 et GL3 n'ont pas été prises en compte dans cette étude (Schaad *et al.*, 2005, 2006). En conséquence la nomenclature actuelle ne reflète pas les relations phylogénétiques entre les lignées. Les souches des différentes lignées génétiques provoquent le même type de symptômes sur *P. vulgaris*. Regroupant des souches phylogénétiquement éloignées ayant au moins un hôte commun, le haricot, ces différentes lignées constituent donc un bon modèle pour étudier la convergence pathologique. Néanmoins,

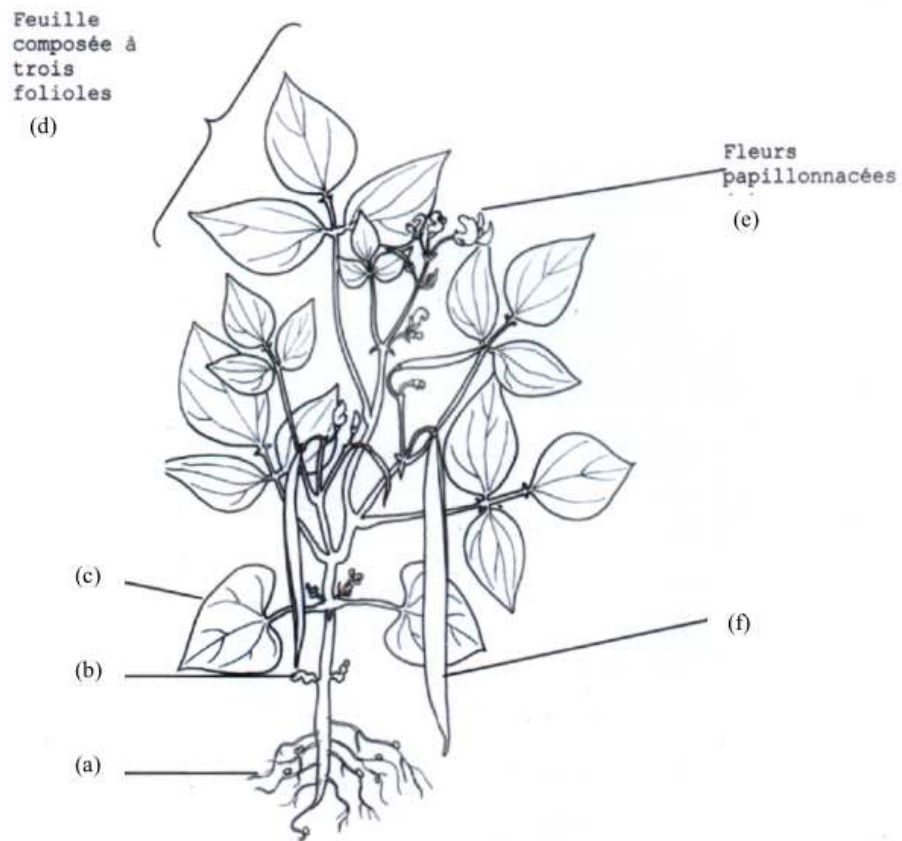


Figure 1.48 : Caractéristiques morphologiques du haricot. (a) racines, (b) cotylédons, (c) cataphylle, (d) feuille trifoliolée, (e) fleur, (f) gousse (d'après Messiaen, 1975).

sur *P. vulgaris*, les souches *fuscans* sont généralement plus agressives que les souches non-*fuscans* (Mutlu *et al.*, 2008). Les souches *fuscans* peuvent se différencier sur milieu de culture contenant de la tyrosine. Elles sont, en effet, capables de produire un pigment brun caractéristique (figure 1.35).

4.4.2.2. *Phaseolus vulgaris*

Originnaire d'Amérique latine, le haricot ou *P. vulgaris* (figure 1.48) est une plante dicotylédone de la famille des *Fabaceae* (Messiaen, 1975). Plus de 30 espèces du genre *Phaseolus* ont été décrites. Seulement cinq sont domestiquées : *P. acutifolius* A. Gray (haricot tépari), *P. coccineus* L. (haricot d'Espagne), *P. lunatus* L. (haricot de Lima), *P. polyanthus* Greenman (year-long bean), et *P. vulgaris* L. (haricot commun) (Michael, 1994; Singh, 2001). Le haricot est, à l'état sauvage, une liane tropicale, autogame, à gousses déhiscences, à petites graines non dormantes (Broughton *et al.*, 2003). Les anciennes sélections avaient pour objectifs de gérer la taille des graines, de diminuer la déhiscence des gousses et d'atteindre une germination simultanée des graines (Broughton *et al.*, 2003). La sélection plus récente avait pour objet le raccourcissement du haricot en transformant le bourgeon terminal végétatif en bourgeon floral et en diminuant le nombre et la taille des entrenœuds (Broughton *et al.*, 2003). Ces plantes sont une source de protéines importante pour l'alimentation. Elles sont consommées pour leurs gousses et leurs graines (matures ou immatures), à l'état sec, frais ou en conserve (Broughton *et al.*, 2003). Les graines des haricots contiennent généralement entre 20 et 25 % de protéines dont la phaséoline (Ma et Bliss, 1978; Sturm *et al.*, 1987).

Enjeux et objectifs de la thèse

L'enjeu de ce travail de thèse est de comprendre le rôle du chimiotactisme et de la mobilité flagellaire dans les étapes précoces de l'interaction entre les bactéries phytopathogènes et leurs plantes hôtes. Ce travail pourra éventuellement, à terme, faire l'objet d'applications dont le développement de nouvelles méthodes de lutte contre ces bactéries. Sur la base de ce qui est actuellement connu dans la littérature, il semble qu'aussi bien le chimiotactisme que la mobilité flagellaire aient un rôle important dans la détection de signaux attractifs ou répulsifs et ainsi dans la capacité des bactéries à se diriger vers les sites permettant de coloniser les tissus des plantes hôtes. Cependant, il existe seulement quelques exemples du rôle des MCP dans la fitness des bactéries du genre *Xanthomonas*.

Afin de comprendre le rôle que joue la détection de signaux par les MCP chez *Xanthomonas*, nous avons étudié la distribution et la diversité des MCP chez ces bactéries. L'étude plus approfondie de la structure des MCP de *Xcc* ATCC 33913 a permis d'émettre des hypothèses quant à leurs rôles dans les divers environnements dans lesquels *Xcc* est retrouvé. Ces travaux ont permis de confirmer qu'un allèle d'un MCP, *XCC0324*, est spécifique de l'espèce *X. campestris*. Ainsi, nous faisons l'hypothèse que la détection de signaux par *XCC0324* fait partie de la détermination de la spécificité d'hôte de *Xcc* et de la fitness de *Xcc* sur les *Brassicaceae*, plantes hôtes de *Xcc*. Pour tester cette hypothèse, nous avons inoculé la phyllosphère d'une gamme de plantes hôtes et non-hôtes avec *Xcc* et son mutant dans le gène *XCC0324*. Des nervures centrales de feuilles de choux ont été blessées et inoculées à proximité de la blessure, avec *Xcc* ou son mutant dans le gène *XCC0324*. D'autres tests *in vitro* ont permis d'en savoir un peu plus sur les molécules détectées par *XCC0324* comme étant attractives. Les résultats obtenus pour ce premier modèle ont permis de comprendre, en partie, le rôle de *XCC0324*, dans la fitness et la spécificité d'hôte de *Xcc*.

Ces résultats ont été complétés par l'étude de la distribution du système flagellaire chez les *Xanthomonas* combinée à l'étude de la mobilité de ces *Xanthomonas*. Nous avons pu remarquer que tous les *Xanthomonas* ne sont pas mobiles par nage. Le séquençage des génomes de *Xff* 4834-R (souche non mobile) et de *Xff* CFBP 4884 (souche mobile) a permis de faire des études de génomique comparative. Cette analyse a permis d'émettre des hypothèses quant à l'origine de la délétion dans l'ilot de gènes codant des protéines impliquées dans le système flagellaire de *Xff* 4834-R.

Chapitre 2 :
Distribution et diversité des
senseurs du chimiotactisme
chez les Xanthomonas

1. Introduction

Ce chapitre a comme objectif d'analyser la distribution des gènes codant les MCP dans le genre *Xanthomonas*. La précédente analyse de distribution des MCP (Mhedbi-Hajri et al., 2011) avait été faite par PCR sur une collection de souches comprenant très majoritairement des souches des espèces *X. axonopodis*, *X. vasicola*, *X. campestris* et *X. oryzae*. Il s'agit ici dans un premier temps, d'élargir cette étude à l'ensemble du genre en ayant accès à au moins une souche de chaque espèce décrite dans le genre *Xanthomonas* et pour certaines espèces, à de nombreuses souches représentant leur diversité. Il s'agit également de rechercher l'ensemble des gènes codant potentiellement des MCP par la recherche de la séquence consensus du domaine 'Methyl Accepting' caractéristique des MCP, sans se limiter aux MCP précédemment identifiés comme tels dans quelques génomes de référence. Par ailleurs, cette nouvelle étude vise à rechercher directement dans les séquences génomiques nos cibles sans passer par une technique intermédiaire telle que la PCR. Dans un deuxième temps, nous avons analysé la diversité du MCP XCC0324 chez les souches de *Xanthomonas* dans lesquelles il a été identifié. Associée à l'analyse de l'environnement génomique de XCC0324 chez les *Xanthomonas*, ces études nous permettent d'apporter des éléments, quant à l'histoire évolutive de ce MCP. Un groupe d'allèles de XCC0324 est spécifique de *X. campestris* et est identifié chez *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) et *X. campestris* pv. *raphani* (Xcr) mais pas chez *X. campestris* pv. *incanae* (Xci). L'hypothèse que l'on pose suite à cette étude est que XCC0324 serait en partie responsable de l'élargissement de la gamme d'hôte chez Xcc et Xcr et par son absence responsable de la gamme d'hôte restreinte de Xci.

L'ensemble des résultats obtenus est présenté sous forme d'un article en préparation. Cet article est formaté pour être prochainement soumis dans le journal BMC Genomics.

2. Diversity and distribution of chemotaxis sensors in xanthomonads

Arnaud Indiana^{1,2,3}, Armelle Darrasse^{1,2,3}, Martial Briand^{1,2,3}, Céline Rousseau^{1,2,3}, Marie-Agnès Jacques^{1,2,3,*}

¹ INRA, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49071 Beaucouzé, France.

² AGROCAMPUS OUEST, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49045 Angers, France.

³ Université d'Angers, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 QUASAV, F-49045 Angers, France.

Correspondance

Marie-Agnès Jacques, IRHS, 42, rue Georges Morel, BP60057, 49071, Beaucouzé France,
Tel : +33 2 41 22 57 07, Fax : +33 2 41 22 57 05, email : marie-agnes.jacques@angers.inra.fr

Running title: Distribution of MCPs in xanthomonads

Abstract

Background: Chemotaxis is the mechanism used by bacteria to detect and move in function of the physico-chemical composition of the environment. Attractants and repellents are detected by cell membrane-bound or cytosolic receptors, called Methyl-accepting Chemotaxis Proteins (MCPs). Xanthomonads and in particular *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) are plant associated bacteria responsible for diseases with a high economic impact on large host ranges. These bacteria first colonize the leaf surface, then must ingress inside host tissues to engage pathogenic interactions with their host plants. To ingress, these bacteria should detect attractive signals from the phyllosphere of host plants. The purpose of this study was to gain insights into chemotaxis gene content of xanthomonads and of Xcc ATCC33913 taken as a model.

Results: A wide distribution analysis of chemotactic sensor encoding genes in 133 *Xanthomonas* genomes showed that the average number of genes encoding MCPs per *Xanthomonas* genome was 21. Despite this high number of MCPs per strain, only one MCP was common to all strains and constitute the core MCP group. In contrast, a high number of specific MCPs was found with 33 groups of homologs found in two strains and 37 MCPs found in only one strain. In Xcc ATCC33913, among the 19 MCPs containing a MA domain, 13 MCPs contained also a sensor domain and should be functional. The diversity of sensors identified in these MCPs suggests a great diversity of sensed signals. The MCP XCC0324 previously thought to be specific of Xcc, was found in several lineages of *Xanthomonas*. However, a group of alleles of XCC0324 was confined to *X. campestris*, while groups of divergent alleles were found in phylogenetically closely related strains belonging to species *X. hortorum*, *X. arboricola*, *X. dyei*, and *X. pisi*, none of which being pathogenic on *Brassicaceae*. Polymorphism accumulated in the PAS domain of these divergent alleles. The

44 MCP *XCC0324* was located in Xcc chromosome in the cassette of an integron indicating that
45 it was certainly acquired by horizontal gene transfer.

46 **Conclusions:** Altogether this work indicates that according to the diversity of MCPs found in
47 xanthomonads their importance in lifestyle and plant colonization should be major and for
48 some of them in link with the host range.

49 **Keywords:** Chemotaxis, Methyl-accepting Chemotaxis Protein, *Brassicaceae*,
50 Xanthomonads, Integron, Genomic Island.

51

Background

Bacteria are able to adapt their movement to changes in the physico-chemical composition of the environment [1]. Environmental signals are detected by chemotaxis sensors known as Methyl-accepting Chemotaxis Proteins (MCPs) [2]. Upon detection of a signal, the information is transduced through several phosphorylation reactions from MCPs to the flagellum motor by Che proteins [3]. This system allows the bacterium to move toward an attractive signal or to move away from a repulsive one thanks to flagellar motility [4, 5].

Two types of MCPs have been described in function of the signal detected [6, 7]. On the one hand, chemoreceptors physically bind directly to the chemoeffectors, or to a cofactor, which is bound to the effector. Chemoeffectors are diverse molecules such as amino acids, sugars, pyrimidines or peptides [2, 8, 9]. On the other hand, energy taxis receptors detect indirectly signals *via* their effects on intracellular energy levels. In this case, signals are terminal electron acceptors, light, redox-active compounds, and metabolizable substrates, which act as donors of reducing equivalents to the electron transport system [7].

Typical MCPs, exemplified by Tsr, first identified in *Escherichia coli* [10], are composed of three domains: one sensor domain located in the periplasm or in the cytoplasm that is flanked by two transmembrane regions anchoring it in the bacterial inner membrane; one HAMP (present in histidine kinases, adenylyl kinases, methyl-accepting chemotaxis proteins and phosphatases) domain allowing signal conversion and one cytoplasmic signaling domain (Methyl-Accepting: MA) structured in antiparallel helix [3, 4, 6, 11–14]. The MA domain is highly conserved in MCPs [6, 15], whereas sensor domains are diverse certainly as a result of the diversity of molecules that MCPs can detect [13, 16]. The Per-Arnt-Sim (PAS) domain appears in many MCPs where it is used as a signal sensor domain [17, 18]. Two types of MCP-like sensors, PAS domain-containing sensors and Proton Motive Force (PMF) sensing MCPs, have been reported so far in plant-associated bacteria [6]. These two types of

MCP-like sensors have in common to present a methyl-accepting (MA) domain, which hence can be used to identify such proteins.

The number of genes encoding MCPs per genome is variable according to the bacterial lifestyle (Lacal *et al.*, 2010; Charkowski *et al.*, 2012). For instance, strict pathogens such as *Bacillus anthracis* or bacteria with narrow ecological niches, such as *Nitrosococcus oceani*, *Nitrobacter winogradskyi*, and *Nitrosomonas europaea* contain far less genes encoding MCPs in their genomic sequences than metabolic versatile bacteria such as most species belonging to the genera *Pseudomonas* and *Ralstonia* (an average of 33 and 29 genes encoding MCPs per genome, respectively) [12].

Xanthomonads are bacterial plant pathogens responsible for diseases on more than 400 plants, some of them (rice, citrus, wheat and relatives, banana, legumes...) having a huge economic importance. The bacterial species *X. campestris* contains three pathovars (*campestris*, *raphani*, and *incanae*) defined on the basis of the host range and symptoms that they cause on *Brassicaceae* [19, 20]. *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) is responsible for black rot of *Brassicaceae*. *X. campestris* pv. *raphani* (Xcr) is responsible for leaf spot of *Brassicaceae*. Xcc and Xcr have a large host range whereas, *X. campestris* pv. *incanae* (Xci) causes the bacterial blight of garden stock (*Matthiola incana*) [20].

Events leading to host specificity of plant pathogenic xanthomonads occur as early as chemotactic attraction by the host. Mhedbi-Hajri and colleagues (2011) showed that most pathovars of *Xanthomonas spp.* (*i.e.* groups of strains inducing the same disease on the same host range) are characterized by unique repertoires of genes encoding MCPs, other sensors and adhesins. The analysis of molecular signatures of selection of chemotactic-related genes encoded in these bacterial strains shows that adaptive divergence acts on most genes. These sets of data show that MCPs are shaped by the host [21]. The purpose of this study was to provide deeper insights into chemotaxis gene content of xanthomonads in relation to host

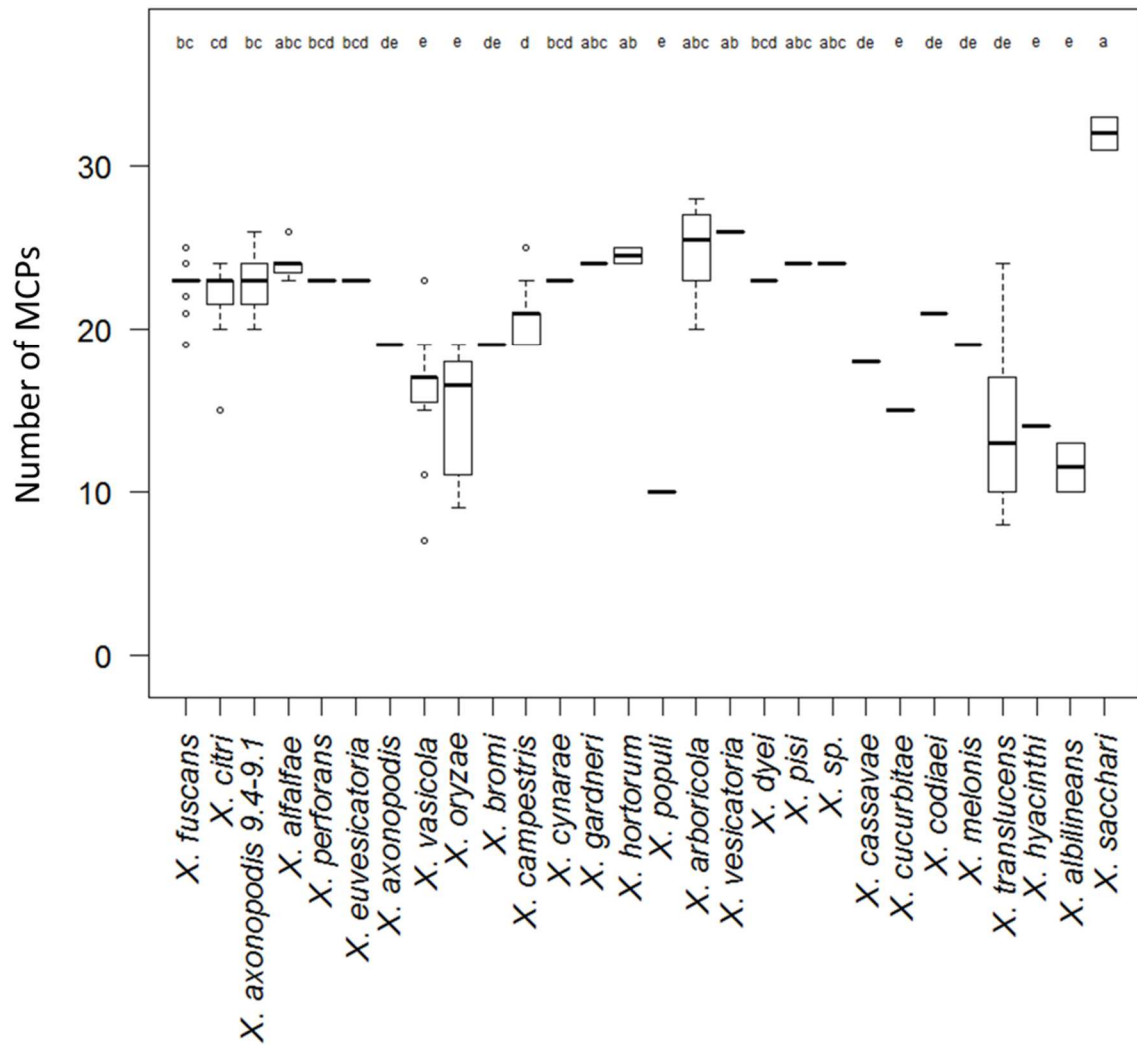


Figure 1 Number of MCP encoding genes per species based on the collection of 133 xanthomonads genomes. Boxplot indicates the median, 25%, 75%, and extreme values of the dataset. Different letters indicate that distributions of MCPs per species are significantly ($p < 0.05$) different on the basis of the Kruskal-Wallis test.

range. We analyzed the distribution of chemotactic sensor encoding genes in a large collection of *Xanthomonas* genome sequences, with a focus on Xcc ATCC33913. The distribution of the MCP XCC0324 previously shown to be restricted to the Xcc was analyzed in details and in link with the host specificities of the strains.

Results

Diversity and genomic localization of genes encoding MCPs in xanthomonads

The diversity of MCP encoding genes present in xanthomonads was assessed by OrthoMCL analysis on 133 genome sequences. These genomes represent all species and a wide range of pathovars of *Xanthomonas* (Additional file 1). Sequences of MCPs were retrieved in the proteomes of these genomes by blastP of the consensus protein sequence of 14,325 MA domains (MA, SM00283). In total 2,799 sequences were retrieved in the 133 xanthomonads sequences, and 11 sequences were retrieved in the *Stenotrophomonas maltophilia* proteomic sequences used as outgroup. It should be noted that no MCP sequences have been identified in the two *Xylella fastidiosa* proteomic sequences that were used as controls. Indeed, *X. fastidiosa* is non motile and hence do not use chemotaxis to adapt its behavior to environmental changes. This reveals the specificity of the sequence retrieval, using this consensus protein sequence of MA domain. The average number of genes coding MCPs per *Xanthomonas* genome was 21.0 and ranged from seven in *X. campestris* pv. *vasculorum* NCPPB1381 to 33 MCPs in *X. sacchari* NCPPB4393 (Figure 1). OrthoMCL analysis identified only one group of homologs (defined here as protein-coding gene sharing at least 80% identity and a *P*-value cut-off of 10^{-5}) conserved in all strains of *Xanthomonas* spp., hence representing the core MCP group. Twelve groups of homologs are present in 99% - 75% of the strains and are defined as conserved MCP group; seven groups of homologs are present in at least 74% - 25% of the strains and are defined as variable MCP group; 33 groups

of homologs are present only in two strains and are defined as rare MCP group; and 37 genes encoding MCPs are present in only one strain of *Xanthomonas* spp. hence defining the group of unique MCPs. The number of rare or unique MCPs represents a low proportion of MCPs in each repertoire and most strains do not present specific MCP (Figure 1, Additional file 1).

Overall we did not find any correlation between the level of conservation of MCP homologs and their location in the genome sequences. Indeed, it is known based on the analysis of high quality fully assembled xanthomonads genomes [22, 23] that a majority of MCP encoding genes clusters within a genomic island, which also contains most flagellar and chemotaxis genes and that only a few MCP, chemotaxis, and flagellar genes are dispersed over the genomes (Figure 2). It was therefore tempting to speculate that the genes encoding the core and conserved fractions of the MCP repertoires were part of the dedicated island and that the plasticity of MCP repertoire was mostly due to dispersed genes. The location of gene encoding MCPs was analyzed on 47 genome sequences of *Xanthomonas* (Figure 3, Table S1). The quality of other sequences was judged insufficient to allow a precise location of the genes. While the gene encoding the core MCP group is located in the chromosomal chemotaxis island of these genomes, only 42% of the conserved homolog groups and a large majority of the variable MCPs (71% of homolog groups) cluster in the chemotaxis island. Furthermore, in the chemotaxis island, most variable homolog groups (14, 15, 17-19) present paralogs. Concerning rare and unique *mcp* genes, 43% and 33% of groups, respectively, are located within the chemotaxis island. Hence, the dispensable fraction of the MCP contents is represented both in the island and all over the genomes, and the diversity of MCP content among xanthomonads does not seem to be mainly due to the acquisition of isolated MCPs.

As a correlation between pathovar clustering and repertoires of MCPs was previously highlighted [21], we looked for *mcp* genes that were confined to strains sharing similar host ranges as potential determinants of host specificity. For those pathovars for which several

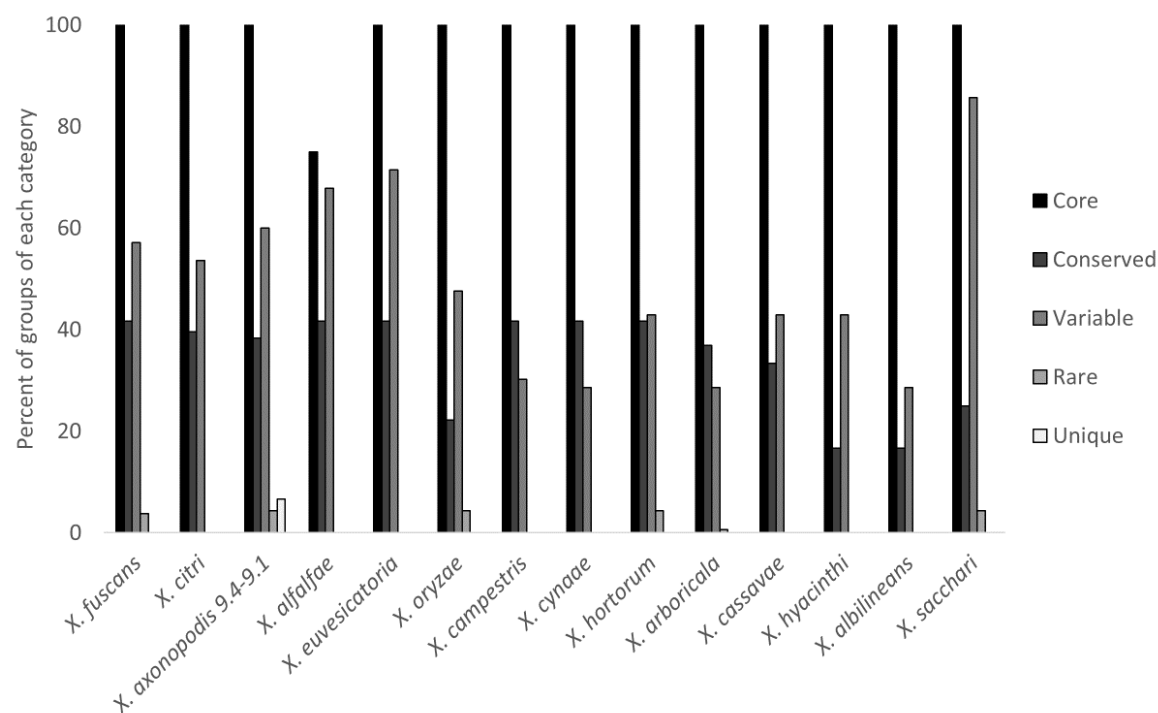


Figure 3 Localization in the chemotactic island of MCP homolog groups per species. The values represent the percent of homolog groups localized in the chemotactic island per conservation group (core, conserved, variable, rare, and unique) and per species. Data could be retrieved for 47 genome sequences, which assembling allowed a precise localization of genes.

genome sequences are available, we found six groups of homologs, which distribution was restricted to one pathovar or a genetic lineage (GL). For example, group 36 is limited to *X. axonopodis* pv. *phaseoli* GL1 strains, group 25 is limited to *X. musacearum* and half of *X. vasculorum* strains, groups 31 and 32 are limited to *X. oryzae* pv. *oryzicola* strains, groups 33 and 39 are limited to *X. translucens* pv. *translucens* and *X. translucens* pv. *graminis* strains (Additional file 1). In contrast to previous results [21], the distribution of XCC0324 (group 22, Additional file 1) was not restricted to Xcc, but orthologs were identified in five species, i.e. *X. campestris*, *X. hortorum*, *X. arboricola*, *X. dyei*, and *X. pisi*.

Chemotaxis gene content of Xcc ATCC33913

Based on the presence of a MA domain, Xcc ATCC33913 genome contained 19 MCPs coding genes to which three genes annotated as MCP could be added [22] (Figures 4 and 5). Thirteen of these genes contained both a MA domain and a sensor domain and could hence be considered as functional MCPs [6, 7]. Only one (XCC1727) of these 13 MCPs should be cytoplasmic, as no transmembrane (TM) regions were predicted in the sequence. The others should be anchored in the cytoplasmic membrane and presented cytoplasmic sensors (three MCPs), periplasmic sensors (eight MCPs) or both (one MCP). The prediction of the sensor domains of XCC1869, XCC1875, XCC1878, XCC1879, XCC1884, XCC2047 was four-Helix Bundles MCP (4HB_MCP, IPR024478). This domain is located between two transmembrane helices indicating that it should detect extracellular signals that passively crossed the external membrane (Figure 5). In XCC1880 one Ca²⁺ channels and CHEmotaxis (CACHE, IPR004010) domain was predicted between two transmembrane helices and should be periplasmic. In XCC3522, the CACHE domain at the N-terminal part of the MCP was followed by a transmembrane helix and should also be periplasmic. One PAS domain (IPR000014) was identified in XCC0324 and in XCC1869. These PAS domains should be located in the cytoplasmic part of the MCP as two transmembrane regions are predicted at the

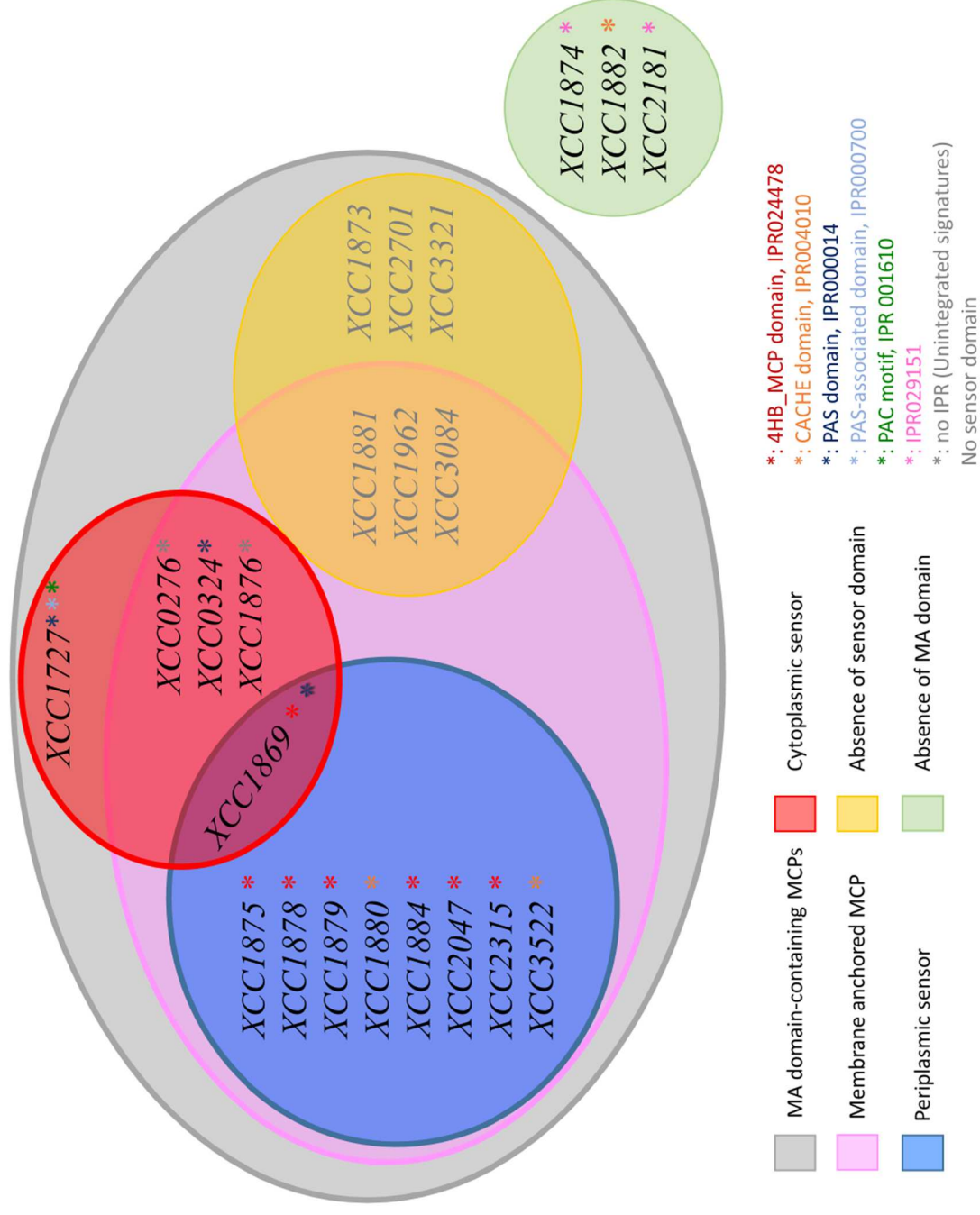


Figure 4 Venn diagram representing the MCPs identified in Xcc ATCC33913. MA domain-containing MCPs and annotated MCPs lacking an MA domain are reported with indications of their cellular localization and type of sensor domain.

N-terminal part of the proteins. The cytoplasmic MCP XCC1727 present three PAS domains (IPR000014), three PAC (PAS motif extended in the carboxyl direction) motifs (IPR001610), and two PAS-associated domains (IPR000700). XCC0276 and XCC1876 present unclassified sensor domains.

Among the incomplete MCPs, at least two pairs of genes could correspond to pseudogenized genes. In these genes, it seems that a sense codon has acquired a point mutation turning it into a stop codon causing premature termination of translation leading to a kind of in-frame stop. *XCC1873* codes for a MA domain, while *XCC1874* codes for a HAMP domain, TM regions and a periplasmic sensor-like domain (IPR029151). These two genes could correspond to the N-terminal and C-terminal parts of complete orthologs (2673 pb) found in *Xcc* ATCC33913 phylogenetically closed strains such as *Xcc* 7700, *Xca* 6865, *Xcr* 756C, *Xcr* 5828, *Xcb* 5825, and *Xci* 1606. Concerning the other couple made of *XCC1881* and *XCC1882*, a preliminary event of duplication of *XCC1880* could have preceded the mutation in the paralog leading to *XCC1881* and *XCC1882*. It should however be noticed that these two pairs of genes are still translated as mRNAs of the correct sizes were identified by transcriptomics (our unpublished data). The four gene fragments, *XCC1962*, *XCC2701*, *XCC2181*, and *XCC3321*, with only a few domains predicted should result from gene erosion. The 622 amino acids long gene *XCC3084* codes for an incomplete MCP since it lacks a sensor domain.

Polymorphism of *XCC0324* orthologs

Our genome survey for MCP encoding genes in xanthomonads revealed that orthologs of *XCC0324* were not restricted to *X. campestris*. In contrast, *XCC0324* orthologs (Additional file 1, group 22) seem to have a distribution loosely correlated with a clade gathering strains from five species: *X. campestris*, *X. hortorum*, *X. arboricola*, *X. dyei*, and *X. pisi*. It was unexpected, as based on the analysis of Mhedbi-Hajri and colleagues (2011), this MCP was

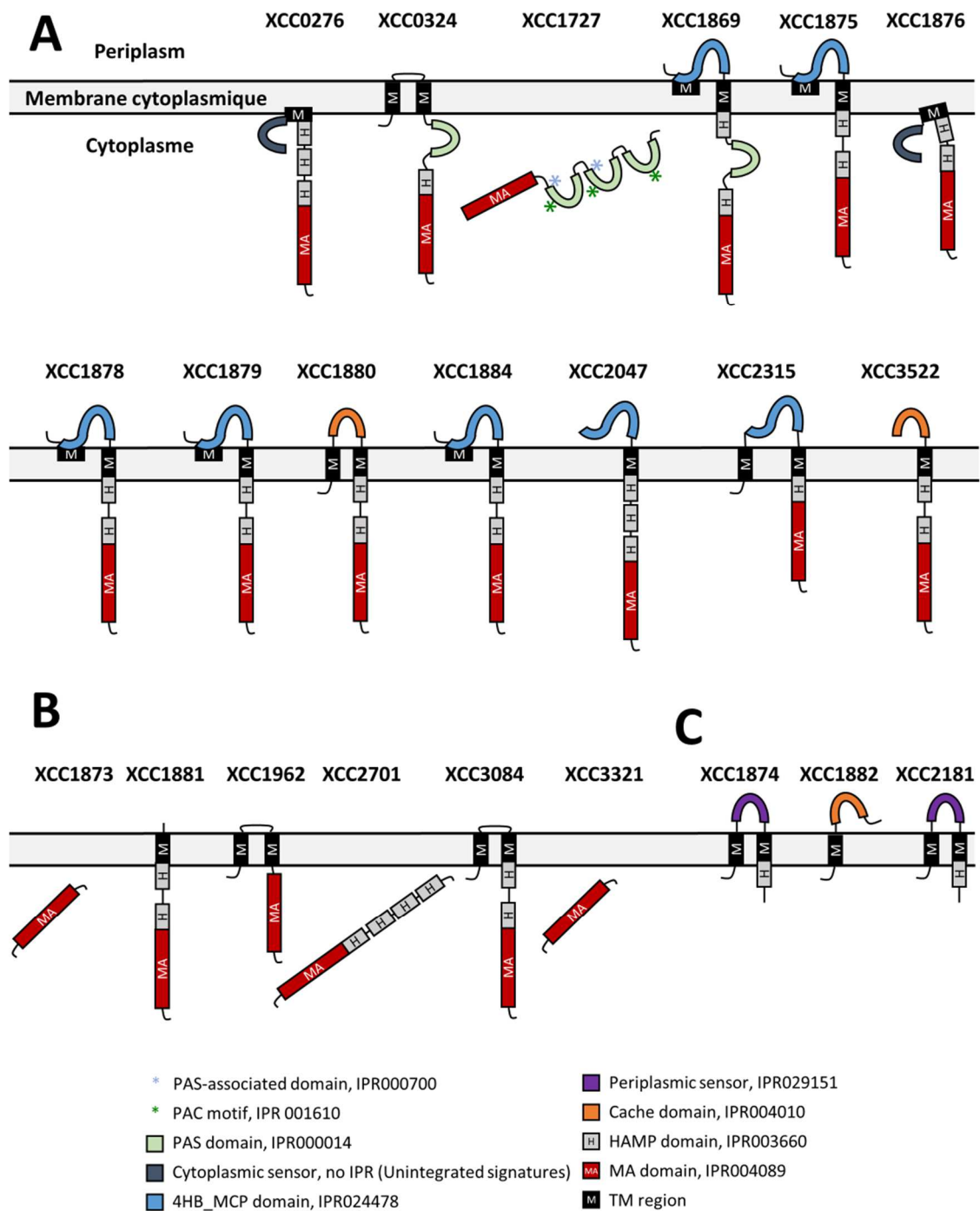


Figure 5 Schematic representation of the structure of MCPs identified in *Xcc* ATCC33913. The domains identified by Interproscan in MA domain-containing MCPs (A), MA domain-containing MCPs but lacking a sensor domain (B) and annotated MCPs lacking an MA domain (C) are indicated together with their predicted cellular localization. TransMembrane region (TM); Histidine kinases Adenylyl cyclases, Methyl-accepting chemotaxis proteins, and Phosphatases domain (HAMP); Ca^{2+} channels and chemotaxis receptors domain (Cache); four-Helix Bundles Methyl-accepting Chemotaxis Protein domain (4HB_MCP); Period circadian protein, Ah receptor nuclear translocator protein, Single-minded protein domain (PAS); PAS C-terminal conserved residues (PAC motif); Methyl-Accepting domain (MA).

Table 1 Polymorphism of *XCC0324* orthologs in Type I and Type II sequences. Descriptive statistics are presented for *XCC0324* orthologs in comparison with sequences of five housekeeping genes. Are displayed the number of analyzed sites (sites); the number of haplotypes (Hap); the values of haplotype diversity (Hd, [45]); the number of nonsynonymous (NS), synonymous (S) and total mutations, the P-value associated with the McDonald and Kreitman's test (***) : <0.001 ; ns: non-significant, nd not determined) (MK test, [48]) the nucleotide diversity indices (Θ_π , [45]; Θ_w , [46]), and the indices from the neutrality tests of Tajima's D [29], Fu & Li's D* and F* [30].

Locus	Sites	Hap	Hd	NS mutations	S mutations	Total mutations	D _N /D _S ; P _N /P _S ; P-value	MK test	Θ_π	Θ_w	Tajima's D	Fu & Li's D*	Fu & Li's F*
<i>XCC0324</i>													
Types I and II	1797	18	0.994	120	388	508	101/96; 108/344; ***		0.13906	0.09856	0.56786	0.06666	0.25312
Type I	1797	7	0.964	17	77	94	nd		0.01753	0.01996	-0.71304	-0.6255	-0.72133
Type II	1797	11	1	95	305	400	nd		0.07815	0.08132	-0.86009	-0.58533	-0.74568
<i>atpD</i>													
Types I and II	1403	18	0.994	9	151	160	0/7; 9/144; ns		0.02763	0.02916	-0.64095	-1.20698	-1.20914
Type I	1403	7	0.964	2	41	43	nd		0.01168	0.01155	-0.06179	-0.17697	-0.16727
Type II	1403	11	1	7	113	120	nd		0.02085	0.02774	-1.37374	-1.43896	-1.61547
<i>dnaK</i>													
Types I and II	1923	18	0.994	12	209	221	1/8; 13/205; ns		0.02801	0.0305	-0.77685	-1.2674	-1.30586
Type I	1923	7	0.964	3	69	72	nd		0.01248	0.01404	-0.73528	-0.84968	-0.91849
Type II	1923	11	1	10	163	173	nd		0.02281	0.02894	-1.32163	-1.22194	-1.41745
<i>efp</i>													
Types I and II	567	16	0.965	6	50	56	1/5; 5/45; ns		0.03015	0.02523	0.27319	-0.31435	-0.16311
Type I	567	5	0.786	0	5	5	nd		0.00334	0.0034	-0.08352	0.12651	0.08576
Type II	567	11	1	5	43	48	nd		0.01956	0.02589	-1.52464	-1.53378	-1.73822
<i>glnA</i>													
Types I and II	1410	18	0.994	10	166	176	0/17; 12/154; ns		0.03774	0.03287	0.06817	-0.02371	0.00441
Type I	1410	7	0.964	2	49	51	nd		0.01472	0.01368	0.2957	0.54768	0.54514
Type II	1410	11	1	10	121	131	nd		0.02449	0.0293	-1.09658	-0.70517	-0.91555
<i>rpoD</i>													
Types I and II	1875	17	0.988	20	212	232	0/9; 23/206; ns		0.03281	0.0338	-0.42992	-0.64269	-0.67475
Type I	1875	6	0.929	16	83	99	nd		0.02211	0.01996	0.46272	0.59694	0.63144
Type II	1875	11	1	8	157	165	nd		0.02213	0.02865	-1.29929	-1.30553	-1.48138

supposed to be restricted to Xcc and Xcr. Here we detected orthologs of XCC0324 in 19 strains out of the 133 analyzed genomes (Additional file 1). However, the protein alignment of these 19 orthologs revealed two types of sequences (Figure 6A and Additional file 3). Each type of sequence was found in a distinct clade of species as indicated by the phylogenetic position of strains (Figure 6B). The type I was present only in the *X. campestris* species, while the type II was found in strains belonging to *X. hortorum*, *X. arboricola*, *X. dyei*, and *X. pisi* species, which are, unlike *X. campestris*, non-pathogenic on *Brassicaceae*. The two types of sequences were significantly divergent according to the McDonald and Kreitman's test (Table 1). Using this test *XCC0324* showed robust signature of adaptive divergence compared to the five housekeeping genes, which did not display any signal of positive selection. The nucleotide diversity indicators were higher within sequences of the type II ($\Theta_{\pi} = 0.07815$ and $\Theta_w = 0.08132$) than within the type I ($\Theta_{\pi} = 0.01753$ and $\Theta_w = 0.01996$). For type I these indicators are similar for *XCC0324* and housekeeping genes, while for type II the indicators are significantly higher for *XCC0324* compared to housekeeping genes indicating that type II *XCC0324* accumulated polymorphism. Indeed, high numbers of non-synonymous replacements were accumulated in the type II *XCC0324* sequences. These nonsynonymous mutations are mainly located in the PAS domain of the type II *XCC0324*, which could indicate adaptive divergence of *XCC0324* orthologs within this cluster (Additional file 3, Table 1). Due to a high frequency of recombination within the sequences of each cluster (data not shown), it was not possible to use models to test advanced hypotheses of evolution on *XCC0324* sequences.

***XCC0324* is part of an integron**

Analysis of the genomic environment of *XCC0324* in Xcc strain ATCC33913 revealed that *XCC0324* is located in the cassette of an integron (Figure 7). Integrons are genetic elements capable of acquiring, rearranging, and expressing genes contained in highly diverse gene

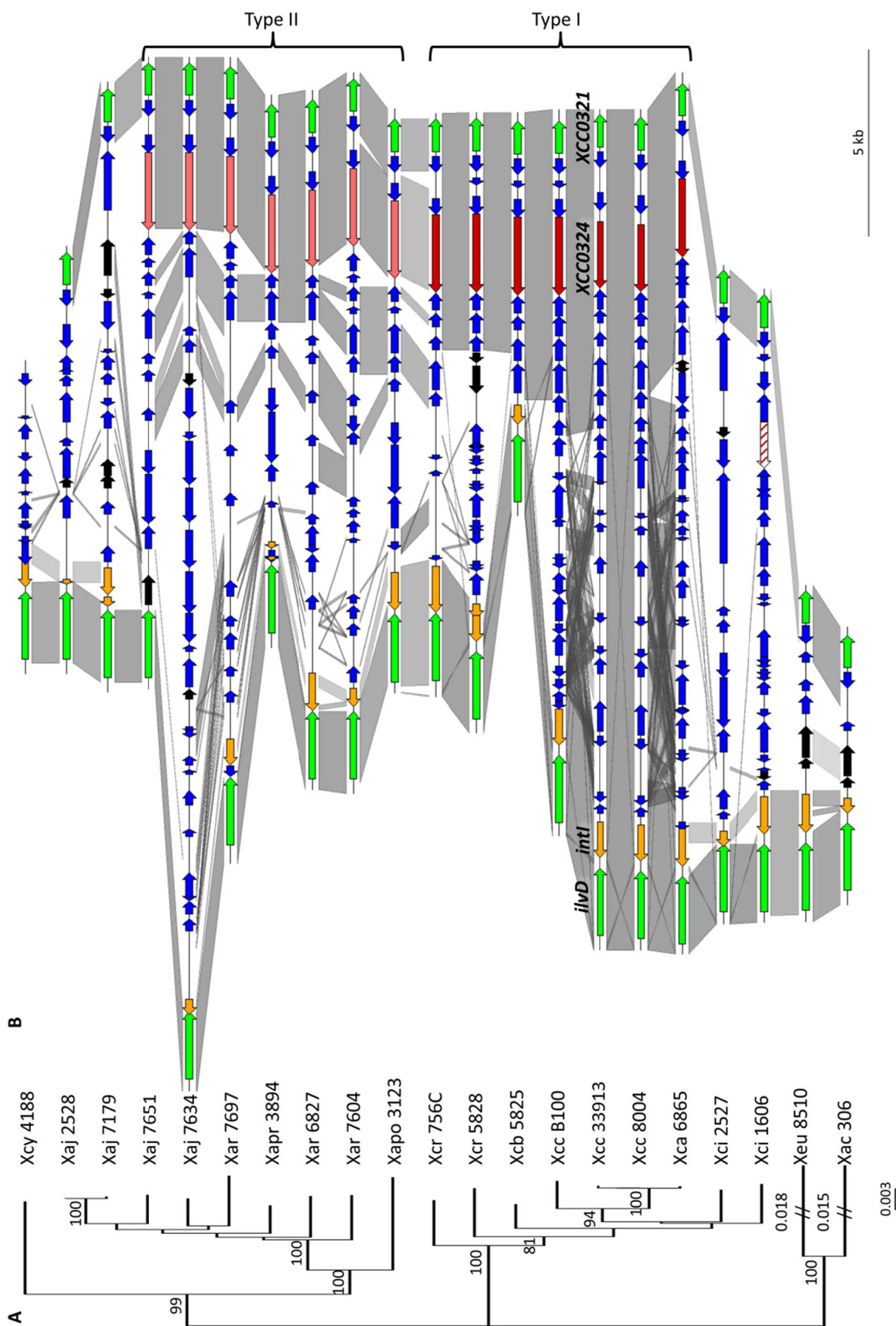


Figure 7 Maps of integrons containing orthologs of XCC0324 in *Xanthomonas* strains in relation to the strain phylogeny. (A) The phylogeny of the 21 strains is indicated in a Neighbor-Joining tree based on the concatenated set of 6 housekeeping gene sequences (*atpD*, *dnaK*, *efp*, *glnAI*, *gyrB* and *rpoD*). Bootstrap scores (1,000 replicates) over 80 are displayed at each node. (B) The gene content of the integron was analyzed in a set of 14 *Xanthomonas* genome sequences containing XCC0324 orthologs (*X. arboricola* pv. *juglandis* CFBP7651 (Xaj 7651), *X. arboricola* pv. *juglandis* CFBP7634 (Xaj 7634), *X. arboricola* pv. *pruni* CFBP3894 (Xapr 3894), *X. arboricola* CFBP6827 (Xar 6827), *X. arboricola* CFBP7604 (Xar 7604), *X. arboricola* pv. *populi* CFBP3123 (Xapo 3123), *X. campestris* pv. *raphani* 756C (Xcr 756C), *X. campestris* pv. *raphani* CFBP5828 (Xcr 5828), *X. campestris* pv. *barbareae* CFBP5825 (Xcb 5825), *X. campestris* pv. *campestris* B100 (Xcc B100), *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 (Xcc 33913), *X. campestris* pv. *campestris* 8004 (Xcc 8004), and *X. campestris* pv. *aberrans* CFBP6865 (Xca 6865)), the genome sequence of one strain containing a Ψ XCC0324 (*X. campestris* pv. *incanae* CFBP1606 (Xci 1606)), the genome sequences of four phylogenetically closely related strains that do not contain XCC0324 orthologs (*Xanthomonas cynarae* CFBP4188 (Xcy 4188), *X. arboricola* pv. *juglandis* CFBP2528 (Xaj 2528), *X. arboricola* pv. *juglandis* CFBP7179 (Xaj 7179), *X. campestris* pv. *incanae* CFBP2527 (Xci 2527)), and the genome sequences of two distant strains (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 85-10 (Xeu 8510), and *X. axonopodis* pv. *citri* 306 (Xac 306)). Nucleic sequences were pairwise blasted using genoPlotR package and Rstudio. In each genome, the ortholog of XCC0324 is part of an integron located downstream of *ilvD*. Genes are represented by arrows following a color code: conserved genes are in green, integrases are in yellow, type I XCC0324 are in red, type II XCC0324 are in pink, Ψ XCC0324 of Xci 1606-R genome sequence is in red diagonal stripes, and genes of transposases are in black. Homology between sequences is represented by grey lines; the darker the grey is, the higher the homology is. These integrons are all on the negative strand.

227 cassettes [24–26]. According to Labbate and colleagues (2009) and Cambray and colleagues
228 (2010), the cassette of the integron of Xcc strain ATCC33913 contains 22 genes downstream
229 of *ilvD* (*XCC0345*) up to *XCC0322* (Figure 7). This integron is known to be broadly
230 distributed in xanthomonads [27]. Indeed, based on the presence of the *intI*, the gene encoding
231 the recombinase, copies of this integron were found in 116 out of the 133 analyzed sequences
232 (data not shown), but only 19 *Xanthomonas* genome sequences present an integron containing
233 an *XCC0324* orthologs. Due to differences in sequence quality among the genomic sequences
234 that contain orthologs of *XCC0324*, we only performed comparative genomics on the integron
235 sequences for 14 *XCC0324* positive and 7 *XCC0324* negative strains (Figure 7B, Additional
236 file 1). Overall the genomic content of each integron is highly variable with the exception of
237 *intI* that is systematically present in this genomic region, except for
238 *X. arboricola* pv. *juglandis* CFBP7651. This is perhaps not surprising since this gene encodes
239 the site-specific recombinase IntI [28]. A set of five genes (*XCC0322*-*XCC0324*, *XCC0326*,
240 and *XCC0328*, in Xcc strain ATCC33913) is conserved among the 14 *XCC0324* positive
241 integrons examined. Although insertion of the *Xanthomonas* integron at the same locus
242 (downstream of *ilvD*) suggests that this genetic element was acquired by the last common
243 ancestor of *Xanthomonas* [27], it could be hypothesized that a particular gene cassette
244 composed in part of *XCC0324* was acquired by the last common ancestor of the clade
245 currently grouping *X. campestris*, *X. cynarae*, *X. gardneri*, *X. hortorum*, *X. populi*, *X.*
246 *arboricola*, *X. vesicatoria*, *X. dyei*, and *X. pisi*, and subsequently lost by *X. cynarae*, *X.*
247 *campestris* pv. *incanae* and some strains of *X. arboricola* pv. *juglandis*. The environment of
248 the *XCC0324* locus seems to have been impacted by more genetic rearrangements in the Type
249 II than in Type I (Figure 7B). Within Type I a higher conservation of the *XCC0324* genetic
250 environments coupled with lower polymorphism of *XCC0324* orthologs, and negative values

for neutrality tests (D of Tajima, 1989; D* and F* of Fu and Li, 1993) suggest that type I *XCC0324* orthologs experienced purifying selection.

Discussion

By which means bacteria do detect a host as a favorable environment to settle on and enter leaf tissues and in contrast detect a non-host plant as an unsuitable environment? It has been shown that chemotaxis is an important trait for pathogenicity of *Ralstonia solanacearum*, since this bacterium is more strongly attracted to root exudates from a host plant than to those from a non-host plant [31]. In addition, mutants of *R. solanacearum* deficient in chemotaxis signal transduction proteins are only impaired in root colonization during the first step of the infection process, a phenomenon that is abolished when the bacteria are directly inoculated into the host vascular system [31]. *Agrobacterium tumefaciens* are attracted at wounded sites by low-molecular-weight phenolic compounds and monosaccharides, which induce virulence genes through a two component regulatory system (for review see [32]). Flavonoids act as chemoattractants and inducers of nodulation genes transcription allowing root infection in the rhizobia – legumes symbiosis [33]. *Dickeya dadantii* is attracted by jasmonic acid, which diffuses from wounds and induces the expression of bacterial genes involved in virulence and survival in the plant apoplast [34]. No data concerning chemoattraction in xanthomonads has so far been provided.

Here we found that xanthomonads have on average 21 genes that contain a MA-domain per genome. This value is higher than the average for bacteria, which was determined to be 13.9 MCPs per genome [12]. Xanthomonads are known to colonize various plant-associated niches, and to face unstable and stressful environments as a consequence of instability of climatic parameters and plant defense molecules. Hence, in accordance with Lacal et colleagues (2010) who indicated that the abundance of MCP genes in bacterial

276 genomes is determined by the metabolic diversity, the stability of the habitat and the ability to
277 interact with other living organisms the xanthomonads lifestyle predicts a high number of
278 MCPs encoding genes. It should however be noticed that the raw number of MCP encoding
279 genes may overestimate the number of functional MCPs. For example, in Xcc ATCC33913
280 only 13 of the 19 MCPs found in the genome of this strain should be functional based on the
281 simultaneous presence of a sensor and a MA domain in the MCP sequences [6, 7]. The low
282 size (one MCP) of the core ‘chemotome’ in the analyzed 133 genome sequences is surprising
283 and has to be compared to the 70 groups present in one or two genomes. The low size of the
284 core ‘chemotome’, composed of a putative partial sequence of MCP, in one hand, and the
285 abundance of rare or specific MCP, in the other hand, suggests that the perception of the
286 environment is highly specific among these plant-associated bacteria. With the diversity of
287 domains predicted in the sensors of the xanthomonads MCPs, a large range of molecules and
288 physical parameters could be detected and induced modifications of the bacterial behavior. In
289 Xcc ATCC33913 MCP repertoire at least six types of domains were identified in potentially
290 functional MCPs. Four helix bundles MCPs are known to sense proton motive force, which
291 could be considered as the final outcome of energy generation and hence metabolic activity
292 [6, 35]. Cache-domain represents single ligand binding pocket that accommodates multiple
293 ligands with varying affinity as recently demonstrated for *Campylobacter jejuni* Cj1564,
294 which interacts with the chemoattractants isoleucine, purine, malic acid and fumaric acid and
295 chemorepellents lysine, glucosamine, succinic acid, arginine and thiamine [36]. PAS domain-
296 containing MCP allows sensing a stimulus originating in the electron transport chain. These
297 MCPs sense light, oxygen or redox potential as input signals. For instance, it has recently
298 been shown that Xcc responses to light by 13 PAS domain-containing proteins. Light
299 signaling led to modification of metabolism, motility and virulence [37]. However, no MCPs
300 were involved in light signaling in this strain.

Orthologs of XCC0324 were not restricted to *X. campestris* as previously reported by Mhedbi-Hajri and colleagues (2011). In contrast, comparative genomics based on OrthoMCL analysis indicated that XCC0324 orthologs follow two distinct evolutionary histories. The ancestor of XCC0324 was certainly acquired by a common ancestor of the current *X. campestris*, *X. cynarae*, *X. gardneri*, *X. hortorum*, *X. populi*, *X. arboricola*, *X. vesicatoria*, *X. dyei*, *X. pisi*, and *Xanthomonas* sp., a yet unnamed species. Afterwards, the gene was apparently lost in some taxa (*X. cynarae*, *X. gardneri*, *X. hortorum* pv. *hederae*, *X. populi*, *X. juglandis*, and *X. vesicatoria*) dispersed in-between this clade. During the evolution, two types of alleles were shaped. Type I is limited to *X. campestris*. Polymorphism remains low in this group suggesting purifying selection. The other type of alleles, distributed in four species, presents a high polymorphism. The accumulation of non-synonymous mutations in the sensor domain of XCC0324 within the type II suggests that these alleles faced adaptive divergence. Due to the large range of molecules that MCPs detect, mutations preferentially accumulate in the sensor domain [21, 38], while the signaling domain is highly conserved [15]. Our comparative analysis of the Type I XCC0324 distribution supports the data obtained with PCR by Mhedbi-Hajri and colleagues (2011).

The gene encoding the MCP XCC0324 was acquired and maintained in a chromosomal integron. Integrons are genetic elements, which aggregate mobile gene cassettes by means of a site-specific recombination mechanism [39]. Integrons are capable of acquiring, rearranging, and expressing genes contained in highly diverse gene cassettes [24–26]. Chromosomal integrons were first identified in *Vibrio cholerae* in the 1990s [40], and typically carry more gene cassettes than mobile integrons and of more diverse functions. An integron system consists of an integrase gene (*intI*) mediating recombination between a proximal primary recombination site, attI, and a secondary target, the attC site, and a transcriptional promoter for the cassettes, Pc [28]. Chromosomal integrons have been found in about 10% of the

surveyed bacterial genomes from a wide range of habitat [39]. While phylogenetic analysis of IntI suggests that integrons are ancient structures that have contributed to the evolution of bacterial genomes primarily by vertical inheritance, discrepancies found between the 16S rRNA and the integrase phylogenies suggests that horizontal transfers occurred for those integrons found in *Pseudomonas* and *Xanthomonas* [39]. Gillings and colleagues (2005) noticed that *Xanthomonas* spp. strains within individual pathovars had identical cassettes, and these exhibited no similarity to cassettes detected in other pathovars. Here, we found that *XCC0324* orthologs are present in cassettes of various pathovars belonging to different species. However, the remaining content of these cassettes is highly variable among these strains. This suggests that the ancestral *XCC0324*-containing integron could have been acquired through lateral gene transfer and had access to a diverse pool of mobile elements. Recently, an antibiotic resistance integron was found in *X. oryzae* pv. *oryzae* strains conferring resistance to streptomycin. It seems that there was no direct relationship between the chromosomal and the antibiotic resistance integrons in *X. oryzae* pv. *oryzae* [41].

Conclusions

In conclusion, this distribution analysis indicated that xanthomonads present on average a high number of MCPs encoding genes (21), which is in agreement with a diversified lifestyle requesting the colonization of various plant tissues and plant surfaces submitted to environmental changes. A wide range of sensor domains should allow the direct detection of chemicals as well as the detection of variations in the intracellular energy levels. The focus on *XCC0324* indicates that this gene was acquired in the cassette of an integron and followed two distinct evolutionary histories with purifying selection acting on alleles found in *Brassica* pathogens, whereas diversifying selection generates multiple alleles in closed

phylogenetically strains, which colonizes various other hosts. Functional genetics is now needed to decipher the role of this MCP in plant colonization.

Methods

Genomic comparisons

A total of 133 *Xanthomonas* spp., 1 *Stenotrophomonas maltophilia* and 2 *Xylella fastidiosa* genomic sequences was collected (Additional file 1). The consensus protein sequence of 14,325 MA domains (SMART's nrdb database: <http://smart.embl-heidelberg.de/>) was blasted (blastP) on the proteomes of the 136 genome sequences to establish a list of MA domain containing genes. Clustering of homologs (referring to groups of orthologs having or not in-paralogs) was achieved by orthoMCL analyses [42]. OrthoMCL clustering analyses were performed using the following parameters: P-value Cut-off = 1×10^{-5} ; Percent Identity Cut-off = 0; Percent Match Cut-off = 80; MCL Inflation = 1.5. Interproscan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>) [43] was used to localized domains and specific regions in proteins.

Analysis of the genomic environment of *XCC0324*

A set of 14 *Xanthomonas* genome sequences containing *XCC0324* orthologs (*X. arboricola* pv. *juglandis* CFBP7651 (Xaj 7651), *X. arboricola* pv. *juglandis* CFBP7634 (Xaj 7634), *X. arboricola* CFBP7697 (Xar 7697), *X. arboricola* pv. *pruni* CFBP3894 (Xapr 3894), *X. arboricola* CFBP6827 (Xar 6827), *X. arboricola* CFBP7604 (Xar 7604), *X. arboricola* pv. *populi* CFBP3123 (Xapo 3123), *X. campestris* pv. *raphani* 756C (Xcr 756C), *X. campestris* pv. *raphani* CFBP5828 (Xcr 5828), *X. campestris* pv. *barbareae* CFBP5825 (Xcb 5825), *X. campestris* pv. *campestris* B100 (Xcc B100), *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 (Xcc 33913), *X. campestris* pv. *campestris* 8004 (Xcc 8004), *X. campestris* pv. *aberrans* CFBP6865 (Xca 6865), the genome sequence of one strain containing a Ψ *XCC0324* (*X.*

375 *campestris* pv. *incanae* CFBP1606 (Xci 1606)), the genome sequences of four
376 phylogenetically closely related strains that do not contain *XCC0324* orthologs (*Xanthomonas*
377 *cynarae* CFBP4188 (Xcy 4188), *X. arboricola* pv. *juglandis* CFBP2528 (Xaj 2528), *X.*
378 *arboricola* pv. *juglandis* CFBP7179 (Xaj 7179), *X. campestris* pv. *incanae* CFBP2527 (Xci
379 2527)), and the genome sequences of two distant strains (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* 85-10
380 (Xeu 8510), and *X. axonopodis* pv. *citri* 306 (Xac 306)) were pairwise blasted to analyze the
381 genomic environments of *XCC0324* orthologs or integron organization using the R package
382 genoPlotR.

383 **Phylogenetic analyses**

384 The complete nucleotide sequences of a set of six housekeeping genes (*atpD*, *dnaK*, *efp*,
385 *glnA*, *gyrB* and *rpoD*) were extracted from the 136 genomic sequences (Additional file 1).
386 Whole amino acid sequences were aligned using MUSCLE (Seaview,
387 <http://doua.prabi.fr/software/seaview>) and transposed back to nucleotide sequence level to
388 gain a codon-based alignment. Sequences were concatenated following the alphabetic order of
389 the genes, ending in a sequence of 7,841 bp (1-1,379 for *atpD*, 1,380-2,414 for *dnaK*, 2,415-
390 2,963 for *efp*, 2,964-4,318 for *glnA*, 4,319-6,647 for *gyrB* and 6,648-7,841 for *rpoD*).
391 Neighbor-joining (NJ) tree [44] was generated by using the Jukes-Cantor distance methods
392 and bootstrap values (1,000 iterations) calculated for the concatenated nucleotide sequences.

393 ***XCC0324* sequence analyses**

394 Haplotype (Hap) numbers, haplotype diversity (Hd) values [45], nucleotidic diversity (Θ_π)
395 and nucleotidic polymorphism (Θ_w) [45, 46], and neutrality estimates (Tajima's D and Fu and
396 Li's D* and F*) [29, 30] were estimated for *XCC0324* sequences and the five housekeeping
397 genes (*atpD*, *dnaK*, *efp*, *glnA*, *rpoD*) for each type (I, II, and I and II) using DnaSP, version
398 4.0 [47]. The McDonald and Kreitman's test [48] was performed using DnaSP to test the
399 divergence between the two clusters.

400

401 **Additional files**

402 **Supporting information**

403 **Additional file 1 MCP content of 133 *Xanthomonas* strains faced with the phylogenetic**
404 **position of the strains.** A list of MA domain-containing proteins was established following
405 BlastP of the consensus protein sequence of MA domains on the proteomes. Clustering of
406 homologs (referring to groups of orthologs having or not in-paralogs) in 94 groups was
407 achieved by orthoMCL analyses. A NJ tree based on the concatenated complete sequences of
408 *atpD*, *dnaK*, *efp*, *glnA*, *gyrB*, and *rpoD* is displayed on the left hand side of the table.
409 Bootstrap scores (1,000 replicates) above 80% are displayed at each node.

410 **Additional file 2 Localization of MCP encoding genes in *Xanthomonas* genomes.** For each
411 genome, genes encoding homologs that are indicated by a bold and red value are localized in
412 the chemotaxis island. Otherwise, the genes are localized in other parts of the genomes. The
413 values represent the number of homologs (orthologs and paralogs) in each genome. Data
414 could be retrieved for 47 genome sequences, which assembling allowed a precise localization
415 of genes.

416 **Additional file 3 Alignment of amino-acid sequences of XCC0324 orthologs.** (A)
417 Sequences were aligned using Multalin (Corpet, 1988). Based on the protein sequences of
418 XCC0324 and of one of its ortholog in Type II (XARJCFBP7651_a01640 of *X. arboricola*
419 *pv. juglandis* CFBP7651), functional domains were predicted using interproscan software.
420 Blue, green, and orange frames represent the PAS domain (SSF55785), the HAMP domain
421 (PS50885) and the MA domain (PF00015), respectively. (B) For each region of the protein a
422 global percentage of identity was calculated based on the number of identical amino acid to
423 the total number of amino acids. The percentage of equivalent function was calculated based
424 on the number of equivalent amino acids to the total number of amino acids. Amino acids (!,

\$, #, %) are considered equivalent when they have similar physico-chemical properties, and
 that their substitution have no impact on the protein secondary structure. (1) no functional
 domains have been identified using interproscan in XCC0324 sequence and in
 XARJCFBP7651_a01640. The aligned sequences were retrieved from *X. campestris* pv.
aberrans CFBP6865 (XCCCFBP6865), *X. campestris* CFBP7700 (XCMPCFBP7700), *X.*
campestris pv. *raphani* 756C (XCR), *X. campestris* pv. *campestris* 8004 (XC), *X. campestris*
 pv. *campestris* ATCC33913 (XCC), *X. campestris* pv. *campestris* B100 (xccb100), *X.*
campestris pv. *raphani* CFBP5828 (XCRCFBP5828), *X. campestris* pv. *barbareae*
 CFBP5825 (XCCFBP5825), *X. hortorum* pv. *carotae* M081 (XHC), *X. arboricola* pv. *populi*
 CFBP3123 (XAPLCFBP3123), *X. arboricola* pv. *corylina* CFBP1159 (XACYCFBP1159), *X.*
arboricola CFBP6827 (XARBCFBP6827), *X. arboricola* pv. *juglandis* CFBP7634
 (XARJCFBP7634), *X. arboricola* pv. *pruni* CFBP3894 (XAPNCFBP3894), *X. arboricola*
 CFBP7604 (XARBCFBP7604), *X. arboricola* pv. *juglandis* CFBP7651 (XARJCFBP7651),
X. arboricola CFBP7697 (XARBCFBP7697), *X. pisi* CFBP4643 (XPICFBP4643), and *X.*
dyei CFBP7245 (XDYCFBP7245) protein sequences.

Abbreviations

MCP: Methyl-Accepting Chemotaxis Protein; MA: Methyl-Accepting; HAMP: present in
 histidine kinases, adenylyl kinases, methyl-accepting chemotaxis proteins and phosphatases;
 PAS: Period circadian protein, Ah receptor nuclear translocator protein, Single-minded
 protein; CACHE: Ca²⁺ channels and chemotaxis receptors; 4HB_MCP: four-Helix Bundles
 Methyl-accepting Chemotaxis Protein; Xcc: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; Xcr:
Xanthomonas campestris pv. *raphani*; Xci: *Xanthomonas campestris* pv. *incanae*.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author contribution

AI and AD contributed to analysis of data and drafted parts of the manuscript. MB contributed to the OrthoMCL and integron analyses. CR contributed to integron and polymorphism analyses. MAJ conceived the study, contributed to analysis of the data, wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Arnaud Indiana is funded by a PhD grant from INRA-SPE and La Région Pays de la Loire, France. This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche (XanthomiX, ANR-2010-GENM-013) and by the AIP Bioressources project Taxomic (2012). The authors gratefully acknowledge Sebastien Carrère and Jérôme Gouzy for assembling and annotating genome sequences, Marion Fischer-Le Saux, Perrine Portier, Ralf Koebnik, Laurent D. Noël and Lionel Gagnevin for sharing unpublished genome sequences, and Matthieu Barret for critical review of the manuscript.

References

1. Porter SL, Wadhams GH, Armitage JP: **Signal processing in complex chemotaxis pathways.** *Nat Rev Microbiol* 2011, **9**:153–65.
2. Hazelbauer GL: **Bacterial chemotaxis: the early years of molecular studies.** *Annu Rev Microbiol* 2012, **66**:285–303.
3. Hazelbauer GL, Falke JJ, Parkinson JS: **Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays.** *Trends Biochem Sci* 2008, **33**:9–19.
4. Vladimirov N, Sourjik V: **Chemotaxis: how bacteria use memory.** *Biol Chem* 2009, **390**:1097–104.
5. Sourjik V, Wingreen N: **Responding to chemical gradients : bacterial chemotaxis.** *Curr Opin Cell Biol* 2012, **24**:262–268.
6. Schweinitzer T, Josenhans C: **Bacterial energy taxis: a global strategy?** *Arch Microbiol* 2010, **192**:507–20.

- 477 7. Alexandre G: **Coupling metabolism and chemotaxis-dependent behaviours by energy**
478 **taxis receptors.** *Microbiology* 2010, **156**:2283–93.
- 479 8. Manson MD, Armitage JP, Hoch JA, Macnab RM: **Bacterial locomotion and signal**
480 **transduction.** *J Bacteriol* 1998, **180**:1009–1022.
- 481 9. Liu X, Parales RE: **Chemotaxis of *Escherichia coli* to pyrimidines: a new role for the**
482 **signal transducer Tap.** *J Bacteriol* 2008, **190**:972–9.
- 483 10. Silverman M, Simon M: **Chemotaxis in *Escherichia coli*: methylation of *che* gene**
484 **products.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**:3317–21.
- 485 11. Kentner D, Sourjik V: **Spatial organization of the bacterial chemotaxis system.** *Curr*
486 *Opin Microbiol* 2006, **9**:619–24.
- 487 12. Lacal J, García-Fontana C, Muñoz-Martínez F, Ramos J-L, Krell T: **Sensing of**
488 **environmental signals: classification of chemoreceptors according to the size of their**
489 **ligand binding regions.** *Environ Microbiol* 2010, **12**:2873–84.
- 490 13. Krell T, Lacal J, Muñoz-Martínez F, Reyes-Darias JA, Cadirci BH, García-Fontana C,
491 Ramos JL: **Diversity at its best: bacterial taxis.** *Environ Microbiol* 2011, **13**:1115–24.
- 492 14. Pineda-Molina E, Reyes-Darias J-A, Lacal J, Ramos JL, García-Ruiz JM, Gavira JA,
493 Krell T: **Evidence for chemoreceptors with bimodular ligand-binding regions harboring**
494 **two signal-binding sites.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:18926–18931.
- 495 15. Alexander RP, Zhulin IB: **Evolutionary genomics reveals conserved structural**
496 **determinants of signaling and adaptation in microbial chemoreceptors.** *Proc Natl Acad*
497 *Sci U S A* 2007, **104**:2885–90.
- 498 16. Krell T, Lacal J, Busch A, Silva-Jiménez H, Guazzaroni M-E, Ramos JL: **Bacterial**
499 **sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals.** *Annu Rev Microbiol*
500 2010, **64**:539–59.
- 501 17. McIntosh BE, Hogenesch JB, Bradfield CA: **Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in**
502 **environmental adaptation.** *Annu Rev Physiol* 2010, **72**:625–45.
- 503 18. Taylor BL, Zhulin IB: **PAS domains : internal sensors of oxygen, redox potential, and**
504 **light.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1999, **63**:479–506.
- 505 19. Fargier E, Manceau C: **Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas***
506 ***campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv.**
507 ***campestris*.** *Plant Pathol* 2007, **56**:805–818.
- 508 20. Fargier E, Fischer-Le Saux M, Manceau C: **A multilocus sequence analysis of**
509 ***Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking**
510 **pathovars of this species.** *Syst Appl Microbiol* 2011, **34**:156–65.

- 511 21. Mhedbi-Hajri N, Darrasse A, Pigné S, Durand K, Fouteau S, Barbe V, Manceau C,
512 Lemaire C, Jacques M-A: **Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant**
513 **pathogenic xanthomonads.** *BMC Evol Biol* 2011, **11**:67.
- 514 22. Da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-
515 Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LMC, do Amaral AM, Bertolini MC,
516 Camargo LEA, Camarotte G, Cannavan F, Cardozo J, Chambergo F, Ciapina LP, Cicarelli
517 RMB, Coutinho LL, Cursino-Santos JR, El-Dorry H, Faria JB, Ferreira AJS, Ferreira RCC,
518 Ferro MIT, Formighieri EF, Franco MC, Greggio CC, Gruber A, et al.: **Comparison of the**
519 **genomes of two Xanthomonas pathogens with differing host specificities.** *Nature* 2002,
520 **417**:459–63.
- 521 23. Darrasse A, Carrère S, Barbe V, Boureau T, Arrieta-Ortiz ML, Bonneau S, Briand M,
522 Brin C, Cociancich S, Durand K, Fouteau S, Gagnevin L, Guérin F, Guy E, Indiana A,
523 Koebnik R, Lauber E, Munoz A, Noël LD, Pieretti I, Poussier S, Pruvost O, Robène-
524 Soustrade I, Rott P, Royer M, Serres-Giardi L, Szurek B, van Sluys M-A, Verdier V, Vernière
525 C, et al.: **Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R reveals**
526 **that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads.** *BMC Genomics* 2013,
527 **14**:761.
- 528 24. Mazel D: **Integrans: agents of bacterial evolution.** *Nat Rev Microbiol* 2006, **4**:608–20.
- 529 25. Labbate M, Case RJ, Stokes HW: **The integron/gene cassette system: an active player**
530 **in bacterial adaptation.** *Humana Press* 2009, **532**:103–125. [*Methods in Molecular Biology*]
- 531 26. Cambray G, Guerout A-M, Mazel D: **Integrans.** *Annu Rev Genet* 2010, **44**:141–66.
- 532 27. Gillings MR, Holley MP, Stokes HW, Holmes AJ: **Integrans in *Xanthomonas*: a source**
533 **of species genome diversity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:4419–24.
- 534 28. Rowe-Magnus DA, Guerout A-M, Biskri L, Bouige P, Mazel D: **Comparative analysis**
535 **of superintegrans: engineering extensive genetic diversity in the *Vibrionaceae*.** *Genome*
536 *Res* 2003, **13**:428–42.
- 537 29. Tajima F: **Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA**
538 **polymorphism.** *Genetics* 1989, **123**:585–95.
- 539 30. Fu YX, Li WH: **Statistical tests of neutrality of mutations.** *Genetics* 1993, **133**:693–
540 709.
- 541 31. Yao J, Allen C: **Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the**
542 **bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*.** *J Bacteriol* 2006, **188**:3697–3708.
- 543 32. McCullen CA, Binns AN: ***Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and**
544 **activities required for interkingdom macromolecular transfer.** *Annu Rev Cell Dev Biol*
545 2006, **22**:101–27.
- 546 33. Cooper JE: **Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in**
547 **a molecular dialogue.** *J Appl Microbiol* 2007, **103**:1355–65.

548 34. Antúñez-Lamas M, Cabrera E, Lopez-Solanilla E, Solano R, González-Melendi P, Chico
549 JM, Toth I, Birch P, Pritchard L, Prichard L, Liu H, Rodriguez-Palenzuela P: **Bacterial**
550 **chemoattraction towards jasmonate plays a role in the entry of *Dickeya dadantii* through**
551 **wounded tissues.** *Mol Microbiol* 2009, **74**:662–71.

552 35. Ulrich LE, Zhulin IB: **Four-helix bundle: a ubiquitous sensory module in prokaryotic**
553 **signal transduction.** *Bioinformatics* 2005:45–48.

554 36. Rahman H, King RM, Shewell LK, Semchenko E a, Hartley-Tassell LE, Wilson JC, Day
555 CJ, Korolik V: **Characterisation of a multi-ligand binding chemoreceptor CcmL (Tlp3)**
556 **of *Campylobacter jejuni*.** *PLoS Pathog* 2014, **10**:e1003822.

557 37. Mao D, Tao J, Li C, Luo C, Zheng L, He C: **Light signaling mediated by PAS domain-**
558 **containing proteins in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.** *FEMS Microbiol Lett*
559 2012, **326**:31–9.

560 38. Wuichet K, Zhulin IB: **Molecular evolution of sensory domains in cyanobacterial**
561 **chemoreceptors.** *Trends Microbiol* 2003, **11**:195–200.

562 39. Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW: **Integrans: mobilizable platforms that**
563 **promote genetic diversity in bacteria.** *Trends Microbiol* 2007, **15**:301–9.

564 40. Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J: **A distinctive class of integron in the *Vibrio***
565 ***cholerae* genome.** *Science (80-)* 1998, **280**:605–608.

566 41. Xu Y, Luo Q-Q, Zhou M-G: **Identification and characterization of integron-mediated**
567 **antibiotic resistance in the phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.** *PLoS One*
568 2013, **8**:e55962.

569 42. Li L, Jr Stoeckert CJ, Roos DS: **OrthoMCL: identification of ortholog groups for**
570 **eukaryotic genomes.** *Methods* 2003, **13**:2178–2189.

571 43. Zdobnov EM, Apweiler R: **InterProScan – an integration platform for the signature-**
572 **recognition methods in InterPro.** *Bioinformatics* 2001, **17**:847–848.

573 44. Saitou N, Nei M: **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing**
574 **phylogenetic trees.** *Mol Biol Evol* 1987, **4**:406–25.

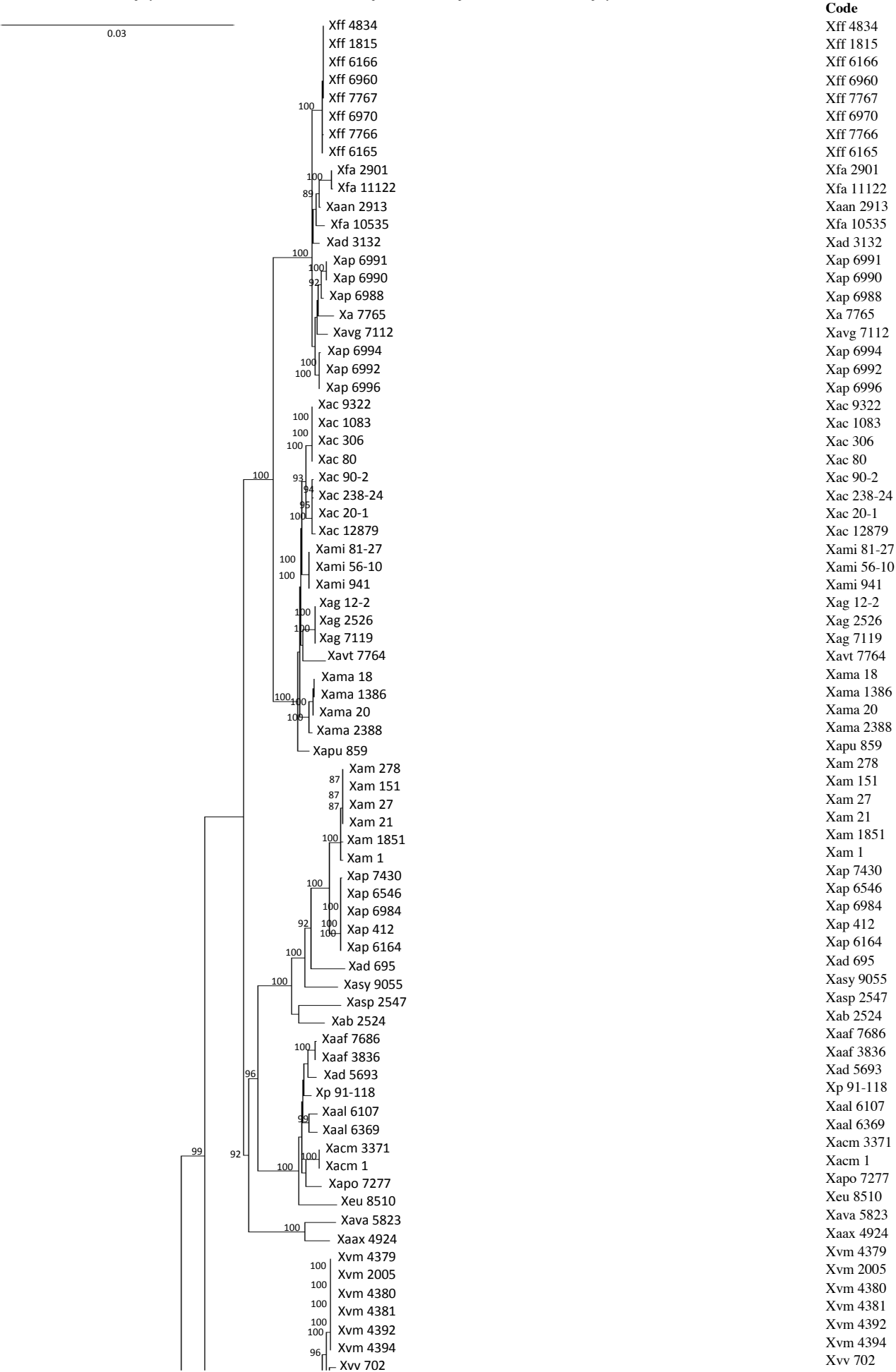
575 45. Nei M: *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia U.; 1987.

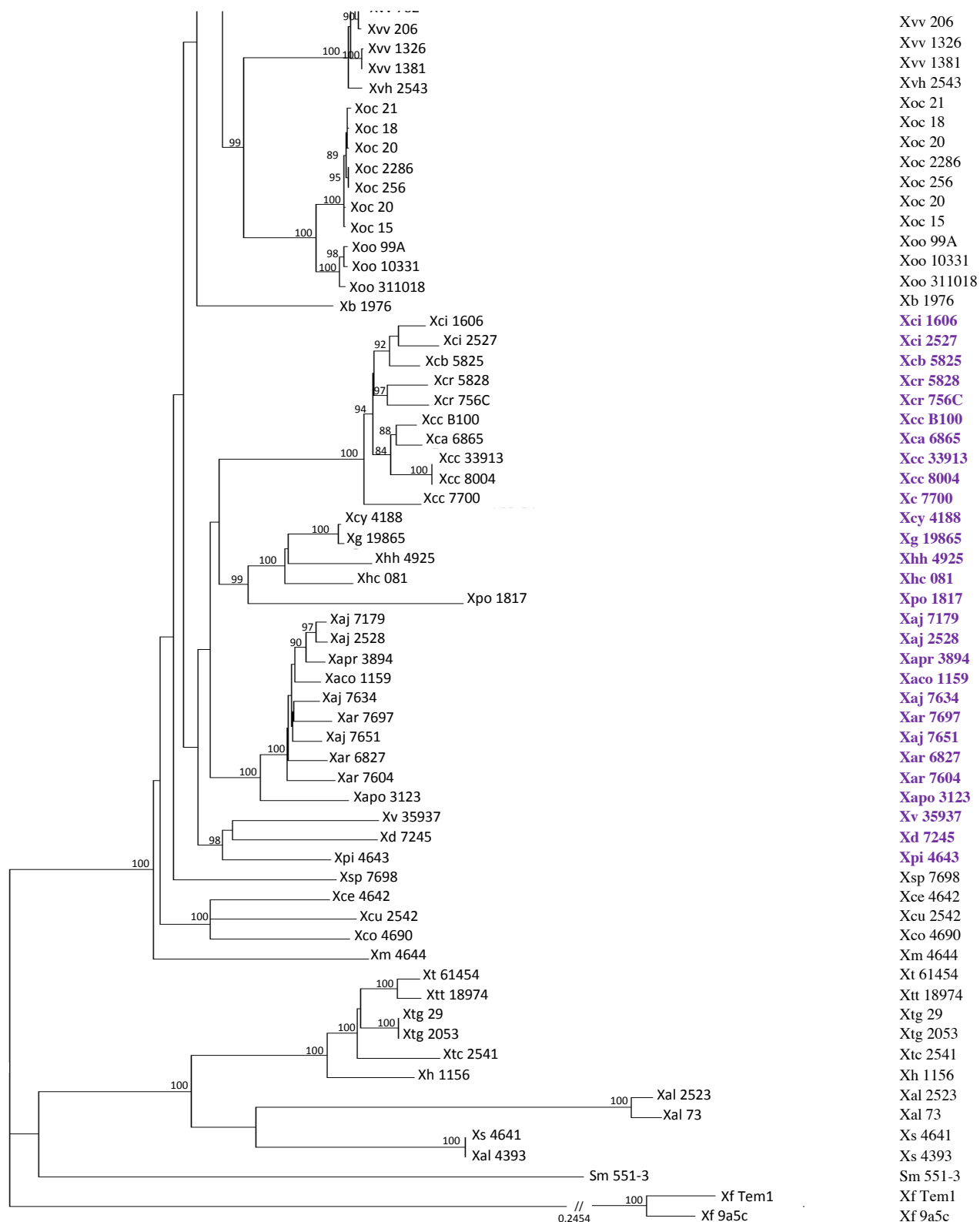
576 46. Watterson G: **On the number of segregating sites in genetical models without**
577 **recombination.** *Theor Popul Biol* 1975, **7**:256–276.

578 47. Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R: **DnaSP, DNA polymorphism**
579 **analyses by the coalescent and other methods.** *Bioinformatics* 2003, **19**:2496–2497.

580 48. McDonald JH, Kreitman M: **Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*.**
581 *Nature* 1991, **351**:652–654.

Additional file S1 Comparison of the MCP content of 133 *Xanthomonas* strains with phylogenetic position of the strains. A list of MA domain-containing proteins was established following BlastP of the consensus protein sequence of MA domains on the proteomes. Clustering of homologs (referring to groups of orthologs having or not in-paralogs) in 94 groups was achieved by orthoMCL analyses. A NJ tree based on the concatenated complete sequences of *atpD*, *dnaK*, *efp*, *glnA*, *gyrB*, and *rpoD* is displayed on the left hand side of the table. Bootstrap scores (1,000 replicates) above 80% are displayed at each node.





Legend

- * Homologs of *XCC0324*
- core group: orthologs present in 100 % of the tested *Xanthomonas*
 - conserved group: orthologs present in 99,9 -75 % of the tested *Xanthomonas*
 - variable group: orthologs present in 74,9-25 % of the tested *Xanthomonas*
 - rare group: orthologs present in more than 2 genomes and up to 24,9 % of the tested *Xanthomonas*
 - orthologs unique to one genome of *Xanthomonas*

Nomenclature	Strain code	BioProject Accession	Assembly	Reference^a
Xanthomonas fuscans subsp. fuscans	4834-R	PRJNA222814	1chr, 3pl	Darrasse et al., 2013
Xanthomonas fuscans subsp. fuscans	CFBP 1815	na	1 chr	our unpublished data
Xanthomonas fuscans subsp. fuscans	CFBP 6166	na	1 chr	our unpublished data
Xanthomonas fuscans subsp. fuscans	CFBP 6960	na	1 chr	our unpublished data
Xanthomonas fuscans subsp. fuscans	CFBP 7767	na	1 chr	our unpublished data
Xanthomonas fuscans subsp. fuscans	CFBP 6970	na	1 chr	our unpublished data
Xanthomonas fuscans subsp. fuscans	CFBP 7766	na	1 chr	our unpublished data
Xanthomonas fuscans subsp. fuscans	CFBP 6165	na	133 contigs	our unpublished data
Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii	CFBP 2901	na	163 contigs	our unpublished data
Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii	ICPB11122	PRJNA18837	237 contigs	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. anacardii	CFBP 2913	na	1 molec	our unpublished data
Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii	ICPB10535	PRJNA47495	352 contigs	Moreira et al., 2010
Xanthomonas axonopodis pv. dieffenbachiae	CFBP 3132	na	185 contigs	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli	CFBP 6991	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli	CFBP 6990	na	1 chr	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli	CFBP 6988	na	1 molec	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis	CFBP 7765	na	122 contigs	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. vignicola	CFBP 7112	na	82 contigs	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli	CFBP 6994	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli	CFBP 6992	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli	CFBP 6996	na	4 molec	our unpublished data
Xanthomonas citri subsp. citri	LMG9322	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas citri subsp. citri	FDC1083	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas citri subsp. citri	306	PRJNA57889	1chr, 2pl	da Silva et al., 2002
Xanthomonas citri subsp. citri	LC80	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas citri subsp. citri	JF90-2	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas citri subsp. citri	JJ238-24	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas citri subsp. citri	LE20-1	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas citri subsp. citri	Aw12879	PRJNA194444	1chr, 2pl	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. mangiferaeindicae	LG81-27	na	6 molec	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. mangiferaeindicae	LG56-10	na	4 molec	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. mangiferaeindicae	LMG941	PRJNA156757	195 contigs	Midha et al., 2012
Xanthomonas axonopodis pv. glycines	12-2	PRJNA20064	465 contigs	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. glycines	CFBP 2526	PRJNA212247	4 molec	Darrasse et al., 2013 GA
Xanthomonas axonopodis pv. glycines	CFBP 7119	PRJNA212249	4 molec	Darrasse et al., 2013 GA
Xanthomonas axonopodis pv. viticola	CFBP 7764	na	76 contigs	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. malvacearum	X18	PRJNA172044	4 molec	Cunnac et al., 2013
Xanthomonas axonopodis pv. malvacearum	GSPB1386	PRJNA180039	127 contigs	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. malvacearum	X20	PRJNA172045	4 molec	Cunnac et al., 2013
Xanthomonas axonopodis pv. malvacearum	GSPB2388	PRJNA180040	61 contigs	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. punicae	LMG859	PRJNA168316	217 contigs	Sharma et al., 2012
Xanthomonas axonopodis pv. manihotis	IBSBF278	PRJNA200222	138 contigs	Bart et al., 2012
Xanthomonas axonopodis pv. manihotis	CIO 151	PRJNA200208	16chr,5pl,15unk	Bart et al., 2012
Xanthomonas axonopodis pv. manihotis	ORSTX27	PRJNA200243	133 contigs	Bart et al., 2012
Xanthomonas axonopodis pv. manihotis	UG21	PRJNA200254	148 contigs	Bart et al., 2012
Xanthomonas axonopodis pv. manihotis	CFBP 1851	PRJNA200206	123 contigs	Bart et al., 2012
Xanthomonas axonopodis pv. manihotis	CIO1	PRJNA200207	128 contigs	Bart et al., 2012
Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli	CFBP 7430	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli	CFBP 6546	na	4 molec	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli	CFBP 6984	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli	CFBP 412	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli	CFBP 6164	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. dieffenbachiae	LMG695	na	1 molec	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. syngonii	LMG9055	na	6 molec	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. spondiae	CFBP 2547	na	167 contigs	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. begoniae	CFBP 2524	na	108 contigs	our unpublished data
Xanthomonas alfalfae subsp. alfalfae	CFBP 7686	na	46 contigs	our unpublished data
Xanthomonas alfalfae subsp. alfalfae	CFBP 3836	PRJNA212245	6 molec	Jacques et al., 2013
Xanthomonas axonopodis pv. dieffenbachiae	CFBP 5693	na	38 contigs	our unpublished data
Xanthomonas perforans	91-118	PRJNA63619	291 contigs	Potnis et al., 2011
Xanthomonas axonopodis pv. allii	CFBP 6107	na	54 contigs	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. allii	CFBP 6369	na	3 molec	our unpublished data
Xanthomonas alfalfae subsp. citrutmelonis	CFBP 3371	na	46 contigs	our unpublished data
Xanthomonas alfalfae subsp. citrutmelonis	F1	PRJNA73179	1chr	Jalan et al., 2011
Xanthomonas axonopodis pv. poinsettiae	CFBP 7277	na	77 contigs	our unpublished data
Xanthomonas euvesicatoria	85-10	PRJNA58321	1chr, 4pl	Thieme et al., 2005
Xanthomonas axonopodis pv. vasculorum	CFBP 5823	na	328 contigs	our unpublished data
Xanthomonas axonopodis pv. axonopodis	CFBP 4924	na	288 contigs	our unpublished data
Xanthomonas vasicola	NCPPB4379	PRJNA200186	95 contigs	Studholme et al., 2010
Xanthomonas vasicola	NCPPB2005	PRJNA200185	156 contigs	Studholme et al., 2010
Xanthomonas vasicola	NCPPB4380	PRJNA200187	87 contigs	Studholme et al., 2010
Xanthomonas vasicola	NCPPB4381	PRJNA55437	116 contigs	Studholme et al., 2010
Xanthomonas vasicola	NCPPB4392	PRJNA200189	162 contigs	unpublished
Xanthomonas vasicola	NCPPB4394	PRJNA200190	85 contigs	Studholme et al., 2010
Xanthomonas vasicola pv. vasculorum	NCPPB702	PRJNA55435	97 contigs	Studholme et al., 2010

Xanthomonas vasicola pv. vasculorum	NCPPB206	PRJNA200193	177 contigs	Studholme et al., 2010
Xanthomonas vasicola pv. vasculorum	NCPPB1326	PRJNA200191	253 contigs	Studholme et al., 2010
Xanthomonas vasicola pv. vasculorum	NCPPB1381	PRJNA200192	337 contigs	Studholme et al., 2010
Xanthomonas vasicola pv. holcicola	CFBP 2543	na	135 contigs	our unpublished data
Xanthomonas oryzae pv. oryzicola	BAI21	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas oryzae pv. oryzicola	MAI18	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas oryzae pv. oryzicola	MAI20	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas oryzae pv. oryzicola	CFBP 2286	na	507 contigs	our unpublished data
Xanthomonas oryzae pv. oryzicola	BLS256	PRJNA54411	1chr	Bogdanove et al., 2011
Xanthomonas oryzae pv. oryzicola	BAI20	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas oryzae pv. oryzicola	BAI15	na	1chr	our unpublished data
Xanthomonas oryzae pv. oryzae	PXO99A	PRJNA153105	1chr	Salzberg et al., 2008
Xanthomonas oryzae pv. oryzae	KACC10331	PRJNA58155	1chr	Lee et al., 2005
Xanthomonas oryzae pv. oryzae	MAFF 311018	PRJNA58547	1chr	unpublished
Xanthomonas bromi	CFBP 1976	na	222 contigs	our unpublished data
Xanthomonas campestris pv. incanae	CFBP 1606	na	1 molec	our unpublished data
Xanthomonas campestris pv. incanae	CFBP 2527	na	1 molec	our unpublished data
Xanthomonas campestris pv. barbareae	CFBP 5825	na	2 molec	our unpublished data
Xanthomonas campestris pv. raphani	CFBP 5828	na	2 molec	our unpublished data
Xanthomonas campestris pv. raphani	756C	PRJNA159539	1chr	Bogdanove et al., 2011
Xanthomonas campestris pv. campestris	B100	PRJNA61643	1chr	Vorhölter et al., 2008
Xanthomonas campestris pv. aberrans	CFBP 6865	na	4 molec	our unpublished data
Xanthomonas campestris pv. campestris	ATCC 33913	PRJNA57887	1chr	da Silva et al., 2002
Xanthomonas campestris pv. campestris	8004	PRLNA57595	1chr	Qian et al., 2005
Xanthomonas campestris	CFBP 7700	na	15 contigs	our unpublished data
Xanthomonas cynarae	CFBP 4188	na	102 contigs	our unpublished data
Xanthomonas gardneri	ATCC 19865	PRJNA63615	552 contigs	Moreira et al., 2010
Xanthomonas hortorum pv. hederae	CFBP 4925	na	313 contigs	our unpublished data
Xanthomonas hortorum pv. carotae	M081	PRJNA231570	154 contigs	Kimbrel et al., 2011
Xanthomonas populi	CFBP 1817	na	407 contigs	our unpublished data
Xanthomonas arboricola pv. juglandis	CFBP 7179	na	14 scaffolds	our unpublished data
Xanthomonas arboricola pv. juglandis	CFBP 2528	na	8 scaffolds	our unpublished data
Xanthomonas arboricola pv. pruni	CFBP 3894	na	77 contigs	our unpublished data
Xanthomonas arboricola pv. corylina	CFBP 1159	na	124 contigs	our unpublished data
Xanthomonas arboricola pv. juglandis	CFBP 7634	na	4 scaffolds	our unpublished data
Xanthomonas arboricola	CFBP 7697	na	8 contigs	our unpublished data
Xanthomonas arboricola pv. juglandis	CFBP 7651	na	6 scaffolds	our unpublished data
Xanthomonas arboricola	CFBP 6827	na	5 contigs	our unpublished data
Xanthomonas arboricola	CFBP 7604	na	6 contigs	our unpublished data
Xanthomonas arboricola pv. populi	CFBP 3123	na	28 contigs	our unpublished data
Xanthomonas vesicatoria	ATCC 35937	PRJNA63613	296 contigs	Potnis et al., 2011
Xanthomonas dyei	CFBP 7245	na	152 contigs	our unpublished data
Xanthomonas pisi	CFBP 4643	na	81 contigs	our unpublished data
Xanthomonas sp.	CFBP 7698	na	29 contigs	our unpublished data
Xanthomonas cassavae	CFBP 4642	PRJNA172046	7 molec	Bolot et al., 2013
Xanthomonas cucurbitae	CFBP 2542	na	181 contigs	our unpublished data
Xanthomonas codiaci	CFBP 4690	na	110 contigs	our unpublished data
Xanthomonas melonis	CFBP 4644	na	37 contigs	our unpublished data
Xanthomonas translucens	DAR61454	PRJNA185791	620 contigs	unpublished
Xanthomonas translucens pv. translucens	DSM18974	PRJNA184834	551 contigs	Studholme et al., 2010
Xanthomonas translucens pv. graminis	ART-Xtg29	PRJNA182100	788 contigs	Whichmann et al., 2013
Xanthomonas translucens pv. graminis	CFBP 2053	na	2 molec	our unpublished data
Xanthomonas translucens pv. cerealis	CFBP 2541	na	10 molec	our unpublished data
Xanthomonas hyacinthi	CFBP 1156	na	104 contigs	our unpublished data
Xanthomonas albilineans	CFBP 2523	na	148 contigs	our unpublished data
Xanthomonas albilineans	GPE PC73	PRJNA43163	1chr, 3pl	Pieretti et al., 2009
Xanthomonas sacchari	CFBP 4641	na	57 contigs	our unpublished data
Xanthomonas sacchari	NCPPB4393	PRJNA86877	470 contigs	unpublished
Stenotrophomonas maltophilia	R551-3	PRJNA58657	1chr	unpublished
Xylella fastidiosa	Temecula1	PRJNA57869	1chr, 1pl	Van Sluys et al., 2003
Xylella fastidiosa	9a5c	PRJNA57849	1chr, 2pl	Simpson et al., 2000

mean
mini
maxi

Number MCP / genome	Number Group / genome	group 1	group 2	group 3	group 4	group 5	group 6	group 7
21	17	1	1	1	4	1	1	1
23	19	1	1	1	4	1	1	1
23	19	1	1	1	4	1	1	1
23	19	1	1	1	4	1	1	1
23	19	1	1	1	4	1	1	1
23	19	1	1	1	4	1	1	1
23	19	1	1	1	4	1	1	1
22	19	1	1	1	3	1	1	1
23	21	1	1	1	3	1	1	1
23	21	1	1	1	3	1	1	1
25	19	1	1	1	3	1	1	1
19	18	1	1	1	2	1	1	0
24	20	1	1	1	3	1	1	1
23	20	1	1	1	3	1	1	1
23	20	1	1	1	3	1	1	1
23	19	1	1	1	3	1	1	1
24	20	1	1	1	3	1	1	1
24	21	1	1	1	3	1	1	1
25	24	1	1	1	1	1	1	1
23	20	1	1	1	3	1	1	1
23	20	1	1	1	3	1	1	1
23	20	1	1	1	3	1	1	1
23	20	1	1	1	3	1	1	1
20	18	1	0	1	2	1	1	1
23	20	1	1	1	3	1	1	1
23	20	1	1	1	3	1	1	1
23	20	1	1	1	3	1	1	1
24	21	1	1	1	3	1	1	1
23	20	1	1	1	3	1	1	1
24	20	1	1	1	3	1	1	1
24	20	1	1	1	3	1	1	1
23	20	1	1	1	3	1	1	1
24	21	1	1	1	3	1	1	1
23	20	1	1	1	3	1	1	1
23	20	1	1	1	3	1	1	1
22	19	1	1	1	3	1	1	1
21	17	1	1	1	3	1	1	1
20	17	1	1	1	3	1	1	1
21	17	1	1	1	3	1	1	1
15	14	1	1	1	0	1	1	1
23	20	1	1	1	3	1	1	1
21	18	1	1	1	2	0	1	1
23	19	1	1	1	3	1	0	1
24	20	1	1	1	2	1	1	1
23	21	1	1	1	2	1	1	1
21	18	1	1	1	2	1	1	1
22	19	1	1	1	2	1	1	1
24	19	1	1	1	3	1	1	1
24	19	1	1	1	3	1	1	1
24	19	1	1	1	3	1	1	1
24	19	1	1	1	3	1	1	1
26	24	1	1	1	0	1	1	1
22	18	1	1	1	3	1	1	1
21	17	1	1	1	3	0	1	1
23	19	1	0	1	3	1	1	1
20	16	1	1	1	3	1	1	0
24	19	1	1	1	3	1	1	1
24	19	1	1	1	3	1	1	1
24	19	1	1	1	3	1	1	1
26	20	1	1	1	3	2	1	1
23	19	1	1	1	3	1	1	1
24	19	1	1	1	3	1	1	1
24	19	1	1	1	3	1	1	1
23	18	1	1	1	3	1	1	1
23	19	1	1	1	3	1	1	1
23	19	1	1	1	3	1	1	1
19	17	1	1	1	3	0	1	1
19	16	1	1	1	3	1	1	1
17	14	1	1	1	3	1	1	1
15	14	1	0	0	2	1	1	1
17	15	1	1	0	3	1	1	1
17	17	1	0	1	0	1	1	0
17	16	1	1	1	2	1	1	1
19	16	1	1	1	3	1	1	1
17	17	1	1	1	1	1	1	1

16	16	1	1	0	1	1	1	1
11	10	1	0	1	2	0	1	1
7	7	1	1	0	1	1	1	0
23	20	1	1	1	3	1	1	1
15	15	1	1	1	1	1	0	1
18	16	1	1	1	3	1	0	1
18	16	1	1	1	3	1	0	1
17	17	1	1	1	1	1	0	1
19	17	1	1	1	3	1	0	1
18	16	1	1	1	3	1	0	1
16	16	1	1	1	1	1	0	1
11	8	2	1	1	3	0	0	0
9	7	1	0	1	3	0	0	0
11	9	1	1	1	3	0	0	0
19	18	1	1	1	2	1	1	1
19	16	1	1	1	2	1	1	1
21	17	1	1	1	2	1	1	1
21	17	1	1	1	2	1	1	1
21	18	1	1	1	2	1	1	1
19	17	1	1	1	2	1	1	1
21	18	1	1	1	3	1	1	1
23	19	1	1	1	2	1	1	1
19	17	XCC1962	XCC1869	XCC2701	XCC1875 and XCC1878	XCC2315	XCC3321	XCC2047
19	17	1	1	1	2	1	1	1
25	21	1	1	1	2	1	1	1
23	19	1	1	1	3	1	1	1
24	20	1	1	1	3	1	1	1
24	20	1	1	1	4	1	1	1
25	23	1	1	1	2	1	1	1
10	10	1	1	1	0	1	1	1
23	19	1	1	1	3	1	1	1
24	20	1	1	1	3	1	1	1
26	21	1	1	1	3	1	1	1
26	22	1	1	1	3	1	1	1
23	18	1	1	1	2	1	1	1
27	22	1	1	1	3	1	1	1
28	22	1	1	1	3	1	1	1
27	22	1	1	1	3	1	1	1
25	21	1	1	1	3	1	1	1
20	16	1	1	1	1	1	1	1
26	21	1	1	1	2	1	1	1
23	19	1	1	1	2	1	1	0
24	20	1	1	1	2	1	1	1
24	19	1	1	1	3	1	1	1
18	17	1	1	1	2	1	1	1
15	14	1	1	1	2	1	1	1
21	19	1	1	1	2	1	1	1
19	16	1	1	1	2	1	1	1
24	19	1	1	2	1	1	1	0
17	13	1	1	1	1	1	0	0
8	8	1	1	0	1	1	0	0
13	13	1	1	1	1	0	1	0
10	10	1	1	1	0	0	1	1
14	12	1	1	1	0	1	1	0
10	9	1	1	0	0	0	1	1
13	10	1	1	0	3	0	1	1
31	24	1	1	2	0	1	1	1
33	31	1	1	2	0	1	1	1
11	6	1	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
21,0	18,0							
7	7							
33	31							

1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0
0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0
1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0
1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0
1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0
3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
3	1	1	1	1	1	2	1	0	0	0	0
3	1	1	1	1	1	2	1	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	2	1	1	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
3	1	1	1	1	1	2	1	1	0	0	1
XCC1879 and XCC1881	XCC1876	XCC3084	XCC3522	XCC1727	XCC1880	XCC1873	XCC1884	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	3	1	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
3	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
2	1	1	1	1	1	0	1	3	1	0	0
2	1	1	1	1	1	0	1	2	1	0	0
3	0	1	1	1	0	1	0	3	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	3	1	0	0
3	1	1	1	1	1	1	1	3	1	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	3	1	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	0	0
3	0	1	1	1	0	0	1	3	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	0	0
2	0	1	1	1	1	1	2	2	1	0	0
2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	0	0
2	1	1	1	1	1	1	2	2	0	0	0
1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1
1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
2	1	1	0	1	0	1	1	2	0	0	0
0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	3	2
0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	3	2
0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	3	0
0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2
0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2
1	1	1	1	0	0	1	1	2	1	5	1
1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	2	0
2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible][illegible][illegible]

group

[illegible][illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Additional file 2 Localization of MCP encoding genes in *Xanthomonas* genomes. For each genome, genes encoding homologs that are indicated by a bold and red value are localized in the chemotaxis island. Otherwise, the genes are localized in other parts of the genomes. The values represent the number of homologs (orthologs and paralogs) in each genome. Data could be retrieved for 47 genome sequences, which assembling allow a precise localization of genes.

Code	group 1	group 2	group 3	group 4	group 5	group 6	group 7	group 8	group 9	group 10	group 11	group 12	group 13	group 14	group 15	group 16	group 17
Xff 4834	1	1	1	4	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	1	0
Xap 6990	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Xap 6988	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	1	2
Xa 7765	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Xap 6994	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Xap 6992	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Xap 6996	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Xac 306	1	0	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	1	1
Xavt 7764	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Xama 18	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	1	2
Xama 20	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Xap 7430	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	0	1	1	1	2	2	1
Xap 6984	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	0	1	1	1	2	2	1
Xap 412	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	0	1	1	1	2	2	1
Xap 6164	1	1	1	0	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0	2	1
Xad 695	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0	2	1
Xaaf 3836	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1
Xaal 6369	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1
Xacm 3371	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1
Xacm 1	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1
Xeu 8510	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1
Xoc 256	1	1	1	3	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1
Xoo 10331	1	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Xoo 311018	1	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Xci 1606	1	1	1	2	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Xci 2527	1	1	1	2	1	1	1	3	1	1	1	1	1	2	1	0	0
Xcb 5825	1	1	1	2	1	1	1	3	1	1	1	1	1	2	1	0	0
Xcr 756C	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Xcc B100	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Xca 6865	1	1	1	2	1	1	1	3	1	1	1	1	1	2	1	1	0
Xcc 33913	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Xcc 8004	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Xc 7700	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	3	1
Xcy 4188	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	0
Xhc 081	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Xaj 7179	1	1	1	3	1	1	1	3	1	1	1	1	1	0	0	1	0
Xaj 7634	1	1	1	2	1	1	1	3	0	1	1	1	0	1	0	3	0
Xar 7697	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	3	1
Xaj 7651	1	1	1	3	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	3	1
Xar 6827	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	3	1
Xar 7604	1	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Xapo 3123	1	1	1	1	1	1	1	3	0	1	1	1	0	0	1	3	0
Xce 4642	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0
Xh 1156	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
Xal 2523	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Xal 73	1	1	0	3	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Xs 4641	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	2	1

Legend

	core group: orthologs present in 100 % of the tested <i>Xanthomonas</i>
	conserved group: orthologs present in 99,9 -75 % of the tested <i>Xanthomonas</i>
	variable group: orthologs present in 74,9-25 % of the tested <i>Xanthomonas</i>
	rare group: orthologs present in more than 2 genomes and up to 24,9 % of the tested <i>Xanthomonas</i>
	orthologs unique to one genome of <i>Xanthomonas</i>

	group 18	group 19	group 20	group 21	group 22	group 23	group 24	group 26	group 28	group 29	group 30	group 31	group 32	group 33	group 34	group 35	group 36	group 37	group 38
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	5	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	0	1	0

[illegible]

Additional file 3 Alignment of amino-acid sequences of XCC0324 orthologs. (A) Sequences were aligned using Multalin (Corpet, 1988). Based on the protein sequences of *XCC0324* and of one of its ortholog in Type II (XARJCFBP7651_a01640 of *X. arboricola* pv. *juglandis* CFBP7651), functional domains were predicted using interproscan software. Blue, green, and orange frames represent the PAS domain (SSF55785), the HAMP domain (PS50885) and the MA domain (PF00015), respectively. (B) For each region of the protein a global percentage of identity was calculated based on the number of identical amino acid to the total number of amino acids. The percentage of equivalent function was calculated based on the number of equivalent amino acids to the total number of amino acids. Amino acids (!, \$, #, %) are considered equivalent when they have similar physico-chemical properties, and that their substitution have no impact on the protein secondary structure. (1) no functional domains have been identified using interproscan in XCC0324 sequence and in XARJCFBP7651_a01640. The aligned sequences were retrieved from *X. campestris* pv. *aberrans* CFBP6865 (XCCCFBP6865), *X. campestris* CFBP7700 (XCMPCFBP7700), *X. campestris* pv. *raphani* 756C (XCR), *X. campestris* pv. *campestris* 8004 (XC), *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913 (XCC), *X. campestris* pv. *campestris* B100 (xccb100), *X. campestris* pv. *raphani* CFBP5828 (XCRCFBP5828), *X. campestris* pv. *barbareae* CFBP5825 (XCCFBP5825), *X. hortorum* pv. *carotae* M081 (XHC), *X. arboricola* pv. *populi* CFBP3123 (XAPLCFBP3123), *X. arboricola* pv. *corylina* CFBP1159 (XACYCFBP1159), *X. arboricola* CFBP6827 (XARBCFBP6827), *X. arboricola* pv. *juglandis* CFBP7634 (XARJCFBP7634), *X. arboricola* pv. *pruni* CFBP3894 (XAPNCFBP3894), *X. arboricola* CFBP7604 (XARBCFBP7604), *X. arboricola* pv. *juglandis* CFBP7651 (XARJCFBP7651), *X. arboricola* CFBP7697 (XARBCFBP7697), *X. pisi* CFBP4643 (XPICFBP4643), and *X. dyei* CFBP7245 (XDYCFBP7245) protein sequences.

Chapitre 3 :

Rôle d'un senseur du
chimiotactisme dans la
spécificité d'hôte de
Xanthomonas campestris
pv. campestris

1. Introduction

Afin de vérifier l'hypothèse concernant le rôle de XCC0324 dans l'élargissement de la gamme d'hôte de *Xcc* et *Xcr*, nous avons entrepris des études de génétique fonctionnelle chez *Xcc* ATCC 33913. Un mutant dans le gène *XCC0324* a été construit chez *Xcc* ATCC 33913. Nous avons comparé le comportement de ce mutant à celui du parent dans la phyllosphère de plantes hôtes et non-hôtes. Nous avons aussi vérifié le rôle de XCC0324 dans la détection de signaux attractif du chou avec le développement d'un test de pouvoir pathogène dépendant du chimiotactisme. Pour vérifier les résultats obtenus *in planta*, des tests d'attraction *in vitro* ont été réalisés.

L'ensemble des résultats obtenus est présenté sous forme d'un article en préparation. Il est formaté pour être prochainement soumis dans le journal mBio.

Dans un deuxième temps, des résultats complémentaires concernant l'expression des gènes codant les MCP sont présentés. Afin de comprendre le rôle que peuvent jouer les MCP dans la colonisation de l'hôte, nous avons effectivement étudié l'expression des gènes codant les MCP sous l'influence de HrpG, un régulateur à deux composantes induisant l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans l'agressivité et/ou la virulence. Cette analyse a permis d'en savoir plus sur l'expression des MCP chez *Xcc* 8004 et sur l'expression de l'orthologue de *XCC0324*.

2. A single chemotaxis sensor defines *Xanthomonas campestris* host range and restrict it to *Brassicaceae*.

Arnaud Indiana^{1,2,3}, Armelle Darrasse^{1,2,3}, Martial Briand^{1,2,3}, Marie-Noëlle Brisset^{1,2,3}, Jacky Guillaumes^{1,2,3}, Anne Préveaux^{1,2,3}, Laurent D. Noël^{4,5}, Marie-Agnès Jacques^{1,2,3,*}

¹ INRA, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49071 Beaucouzé, France.

² AGROCAMPUS OUEST, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49045 Angers, France.

³ Université d'Angers, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 QUASAV, F-49045 Angers, France.

⁴ INRA, LIPM UMR 441, F-31326 Castanet-Tolosan, France.

⁵ CNRS, LIPM UMR 2594, F-31326 Castanet-Tolosan, France.

Correspondance

Marie-Agnès Jacques, IRHS, 42, rue Georges Morel, BP60057, 49071, Beaucouzé France,

Tel : +33 2 41 22 57 07, Fax : +33 2 41 22 57 05, email : marie-agnes.jacques@angers.inra.fr

Running title: Bacterial ingress into leaf depends on one MCP

ABSTRACT

Deciphering mechanisms shaping bacterial adaptation to host range should help to predict the emergence of- and control- infectious diseases. During the early stages of infection, pathogenic bacteria must enter into host plant tissues to multiply. This process may be mediated by plant signals originating from entry sites. Chemotaxis allows motile bacteria to detect and move toward attractants and from repellents through detection by cell membrane-bound chemoreceptors, called Methyl-accepting Chemotaxis Proteins (MCPs). To test the contribution of chemotaxis to leaf ingress, the genes encoding a key element of the chemotactic signal transduction system, CheY, and one MCP XCC0324 were mutagenized in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) strain ATCC33913, a vascular pathogen of brassicas. Both genes were required for an efficient internalization into leaf tissues of host plants, such as radish and arabidopsis. XCC0324 was required for the attraction of *Xcc* by a wound on cabbage leaves. XCC0324 renamed Hsb1 for host specificity in brassicas was not involved in aggressiveness *per se*, as observed following injection of *Xcc* Δ *hsb1* directly into leaf vasculature. Based on capillary assays Hsb1 conferred to *Xcc* the ability to detect sinigrin and L-phenylalanine. A structure-based homology search identified a cytosolic Per-ARNT-Sim, (PAS) sensor domain in Hsb1. No link between attraction and metabolization of sinigrin and L-phenylalanine could be evidenced. Our results show that Hsb1 plays a role in the detection of attractive signal(s) leading to ingress into host leaf tissues by a yet unknown mechanism.

IMPORTANCE

Understanding the initial steps of the bacterial colonization is essential to control bacterial diseases of plants. During the early stages of infection, pathogenic bacteria must enter into host plant tissues to colonize the vasculature and multiply. Bacterial ingress may be mediated by plant signals originating from wounds or natural openings. Chemotaxis may allow bacteria

46 to reach favorable or to avoid repulsive sites of entry. Our study reveals that events leading to
47 host specificity occur as early as chemotactic attraction by host for a bacterium pathogenic of
48 brassicas. A chemotaxis sensor, Hsb1, is indeed able to detect attractive signals from host
49 plants and repulsive ones from non-host plants. In particular Hsb1 detects attractive signals
50 from cabbage leaf wounds. In addition, this study shows that Hsb1 senses sinigrin as an
51 attractive molecule. Sinigrin is a glucosinolate widely distributed in brassicas. This work
52 evidenced the contribution of chemotaxis in the *Xcc*-brassicas interaction.

Bacteria employ various taxis strategies to cope with changing environmental conditions. For instance, bacteria are able to modify their cellular motility in response to fluctuations of temperature, light, chemical concentration or magnetic fields (1). Chemotaxis is one of the best studied examples of this behavior in allowing motile bacteria to detect and move in function of the chemical composition of the environment (2–4). Attractive and repulsive molecules are detected by cell membrane-bound or cytosolic chemoreceptors, called Methyl-accepting Chemotaxis Proteins (MCPs). Upon detection of a signal, conformational change results in autophosphorylation of the histidine kinase, CheA, which associates with the MCP through the coupling protein, CheW, and by a phosphorylation cascade up to CheY, the last key protein of the chemotaxis pathway (5–8). The phosphorylated form of CheY (CheY-P) interacts with the flagellar motor protein FliM. This interaction modifies the conformation of FliM and results in a change of the direction of flagellum rotation to alter swimming direction (2, 9–11).

Knowledge of molecular mechanisms involved in bacterial ingress into plant tissue is an important question in plant pathology, since bacteria, unlike most fungi, lack dedicated structures to achieve this step. Usually, bacteria enter through natural openings such as stomata, hydathodes, lenticels and wounds. A few natural attractants for bacteria have been identified at sites of plant entry. The best known examples are low-molecular-weight phenolic compounds and monosaccharides, which attract *Agrobacterium tumefaciens* at wounded sites and induce virulence genes through a two component regulatory system (for review see (12)). In the rhizobia – legumes symbiosis flavonoids act as chemoattractants and inducers of nodulation gene transcription allowing root infection (13). Another well-documented example is the role of jasmonic acid in attraction of *Dickeya dadantii*. For instance, Antunez-Lamas and colleagues (2009) (14) have demonstrated that jasmonic acid not only acts as a plant defense signal but also as a strong attractant at wounds for *D. dadantii*. Furthermore, jasmonic

acid induces the expression of bacterial genes involved in virulence and survival in the plant apoplast (14). It has been shown that chemotaxis is an important trait for pathogenicity and fitness of *Ralstonia solanacearum*, since this bacterium is more strongly attracted to root exudates from a host plant than to those from a non-host plant (11). In addition, mutants of *R. solanacearum* deficient in chemotaxis signal transduction proteins are only impaired in root colonization during the first step of the infection process, a phenomenon that is abolished when the bacteria are directly inoculated into the host vascular system (11).

As in *R. solanacearum*, events leading to host specificity for plant pathogenic xanthomonads may occur early by bacterial chemotactic attraction by the host (15). Based on an analysis of the presence/absence of candidate genes involved in chemotaxis (25 genes), chemical environment sensing (35 genes), and adhesion (10 genes) on a collection of 173 strains of *Xanthomonas* spp., most pathovars (*i.e.* groups of strains inducing the same disease on the same host range) are characterized by unique repertoires of genes encoding sensors and adhesins (15). Furthermore, the analysis of molecular signatures of selection of chemotactic-related genes encoded in strains belonging to different pathovars has shown that adaptive divergence is acting on most genes. This suggests that these bacterial genes were shaped by the host (15).

Xanthomonas spp. are plant-associated bacteria. Most of them are known as plant pathogens and more than 400 plant species are hosts of xanthomonads (16). However, each strain generally presents a narrow host range, which is restricted to a few species within a single family (17). The *X. campestris* species contains three pathovars (*campestris*, *incanae*, *raphani*) defined on the basis of the host range and symptoms (18, 19). While *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) and *X. campestris* pv. *raphani* (*Xcr*) have a large host range including *Brassica* spp., *Raphanus* spp. and *Arabidopsis thaliana* (18, 20), *X. campestris* pv. *incanae* (*Xci*) is restricted to garden stock (*Matthiola incana*). Hydathodes are major sites of

penetration for *Xcc*, while stomata allows *Xcr* penetration in leaf mesophyll, and wounds are efficient sites of entry for all pathogens (21). Based on a collection of strains belonging to different *Xanthomonas* species, it was shown that one MCP, XCC0324, is specifically found in strains related to *Xcc* and *Xcr* but absent from *Xci*-related strains (15). This result suggests that this MCP could participate in host range definition observed within the *X. campestris* species.

Brassicaceae is a plant family grouping between 3000 and 4000 species spread in approximately 350 genus (22–25). Many species are of economic interest as ornamental or food crops. Glucosinolates are plant secondary metabolites, commonly known as mustard oils, synthesized by *Brassicaceae* and related families (26, 27). All glucosinolates have a common core structure containing a β -D-thioglucose moiety, N-hydroxyiminosulfate esters, and a variable side chain derived from amino acids (28). In defense against pests and pathogens, glucosinolates interact with a specific class of β -thioglucosidases, the myrosinases (29). In intact plant tissues glucosinolates and myrosinase are segregated in different cell compartments. Upon cell breakage, these two elements come into contact leading to cleavage of the glucosinolate, thereby liberating D-glucose and a thiohydroximate-O-sulfate (30). This latter product is labile and undergo spontaneous rearrangements to form a variety of toxic products including nitriles, isothiocyanates, and thiocyanates, which are known for their activities on microbes (30, 31). Glucosinolates and isothiocyanates derivatives are degraded by diverse bacterial species inhabiting the human intestine (32, 33). Sinigrin is an aliphatic glucosinolate first described in black mustard (*Brassica nigra*). Sinigrin concentration in the phloem sap of young leaves of *B. nigra* is higher than 10 mM whereas, it is around 1-2 mM and 3 mM in the phloem sap of mature and senescing leaves, respectively (34).

The aim of this study was to test the role of chemotaxis in host specificity of xanthomonads. We hypothesized that the MCP-encoding gene, *XCC0324*, which is present in

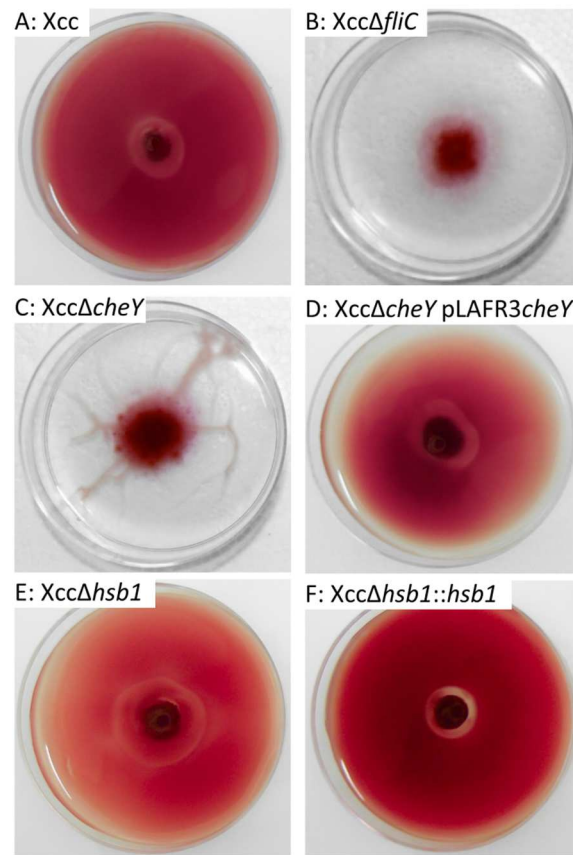


FIG 1 Motility of wild-type, mutants and complemented mutants in soft-agar assay. Soft-agar (0.2%) motility tests imaged five days after inoculation in MOKA medium containing 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride of *Xcc* ATCC33913 (A), *XccΔfliC* (B), *XccΔcheY* (C), *XccΔcheY* pLAFR3*cheY* (D), *XccΔhsb1* (E), and *XccΔhsb1::hsb1* (F). 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride is a redox indicator indicating cellular respiration. Its addition in the medium facilitates the observation of the plates, as the growth of the colony corresponds to the red zone. The uncolored zones are not colonized.

Xcc and *Xcr* genomes but absent from *Xci* genomes (15), is involved in the expansion of the *Xcc* and *Xcr* host range in comparison to *Xci*. To test this hypothesis, we conducted functional genetic experiments with the model strain *Xcc* ATCC 33913. We tested the ability of the wild-type strain, the mutants deleted of *cheY* or *XCC0324* and the complemented mutants to ingress into leaf tissues of host and non-host plants through dynamics of bacterial population sizes of leaves and sterilized leaves. We developed a pathogenicity test to show that *XCC0324*, renamed Hsb1 for host specificity in brassicas is involved in attraction by host plant extracts diffusing from a wound. Capillary assays were monitored to determine the range of molecules and leaf extracts sensed by Hsb1. Structure-based homology searches were run to refine potential mechanisms of Hsb1 taxis. In conclusion, chemotaxis and Hsb1 as a sensor allow *Xcc* to reach favorable sites of ingress into tissues of a susceptible host by a yet unknown mechanism hence playing a significant role in host plant recognition.

RESULTS

The gene *XCC1905* encoding CheY transduces chemotactic information to the flagellum whereas Hsb1 is not requested for *in vitro* flagellar motility. To globally assess the role of chemotaxis in the interactions of *Xcc* with plants, we constructed a deletion mutant in *Xcc* strain ATCC 33913 of a key gene of the chemotactic signal transduction pathway, *cheY*. There are three copies of *cheY* in *Xcc* strain ATCC 33913 genome. The gene *XCC1905*, located in the island dedicated to chemotaxis and motility (35), was considered to be orthologous to *cheY* of *E. coli* (NP_416396) with 63% amino acids identity on 97% of protein length. The two other copies of *cheY* in ATCC 33913 (*XCC1886* and *XCC2053*) presented only 39% and 29% of amino acids identity on 96% and 93% of protein length, respectively. To assess separately the role of swimming motility from chemotaxis in *Xcc* behavior, we constructed a mutant in the flagellin encoding gene, *fliC*. In order to assess the role of *hsb1* in

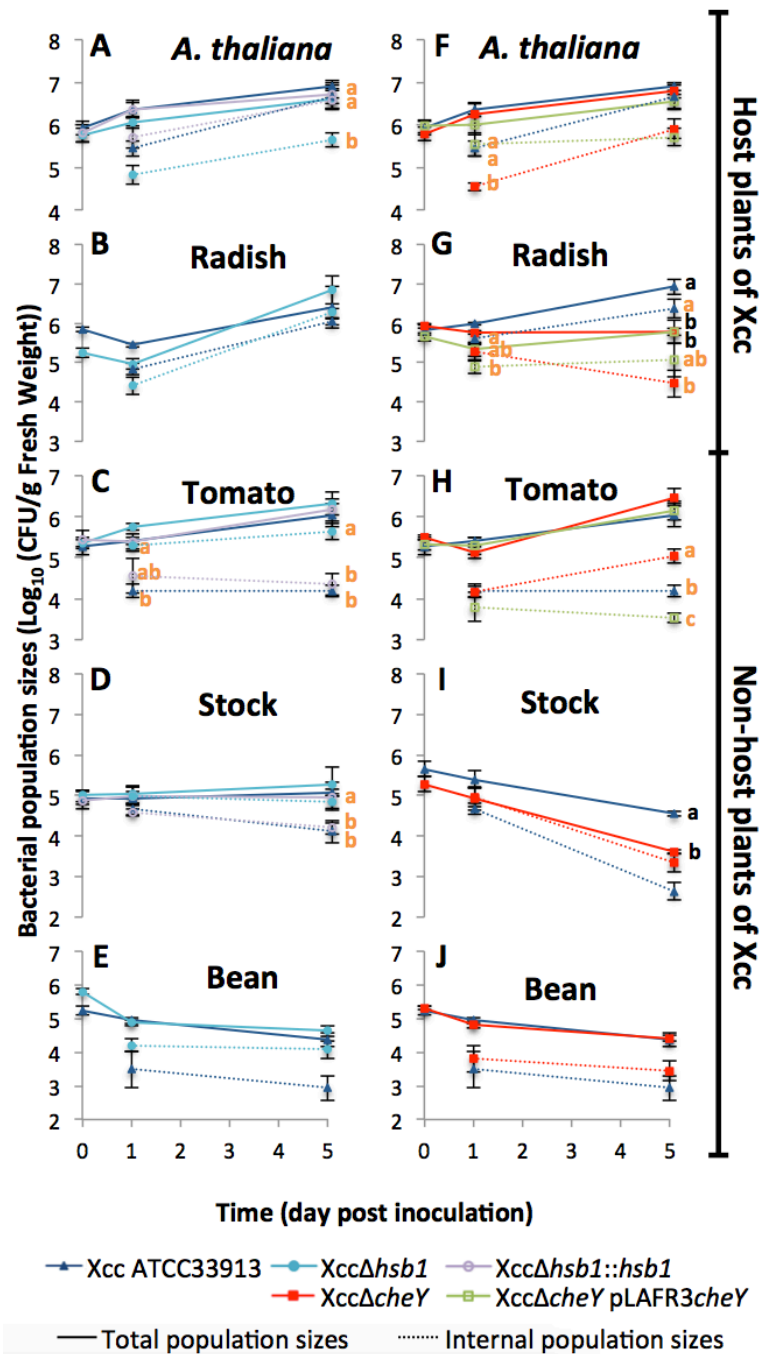


FIG 2 Dynamics of population sizes of Xcc ATCC33913, the chemotactic mutants XccΔhsb1 and XccΔcheY, the complemented mutants, XccΔhsb1::hsb1 and XccΔcheY pLAFR3cheY, and Xci 2527-R in host and non-host plant phyllosphere. The phyllospheres of *A. thaliana* (A, F), radish (B, G), tomato (C and H), stock (D and I), and bean (E and J), were spray-inoculated with bacterial suspensions at 1×10^6 CFU/ml. For each strain, total population sizes (plain line) were quantified 2 h, 1 and 5 days post-inoculation (dpi). Internalized population sizes (dotted lines) determined after leaf surface disinfection with chloroform vapors were quantified 1 and 5 dpi. Means were calculated from the values of five plants per sampling date and per treatment. Error bars represent the standard error of the mean. Within a treatment (strain/day/localization) mean population sizes followed by different letters are significantly ($p < 0.05$) different on the basis of the Mann-Whitney U test. Three independent tests were conducted and similar results were obtained.

chemotactic behavior of *Xcc* strain ATCC 33913, we constructed a deletion mutant of this gene (hereafter named *XccΔhsbI*). This mutant was complemented in *cis* using pΔ13::*hsbI*. The entire gene was integrated in *Xcc* strain ATCC 33913 by electroporation, in its native location in the genome. Each deletion and complementation were validated by sequencing and by testing the absence of impact on *in vitro* growth (data not shown). We verified that the mutant *XccΔhsbI* was motile and tactic, and that *XccΔcheY* was not tactic (Fig. 1). The capacity of this mutant to be tactic was restored by the complementation with pLAFR3::*cheY*. Finally, as expected the aflagelated *XccΔfliC* mutant was not able to swim (Fig. 1).

CheY promotes the entry of *Xcc* in host leaves. In order to assess the *in planta* role of chemotaxis, we compared the behavior of the wild-type and mutant strains in host and non-host plants. The dynamics and localization of bacterial population sizes were monitored on plants that were spray-inoculated until runoff with 1×10^6 cfu/ml inocula. Total population sizes were measured by grinding leaf samples, whereas population sizes located within the leaf tissue (defined here as internal populations) were recovered after leaf surface disinfection with chloroform vapors (36, 37). In *A. thaliana* and in radish internalized populations of the strain *XccΔcheY* were lower than those of the wild-type one and five days post-inoculation (dpi) and this phenotype was partially restored upon complementation (Fig. 2F, 2G). The mutant phenotype could not be totally restored likely due to plasmid instability. Indeed, *in planta* population sizes of *XccΔcheY* pLAFR3*cheY* quantified five dpi in TSA 10% Rif were six times higher than in TSA 10% Rif-Tc indicating the loss of the Tc resistance brought by pLAFR3.

In contrast, in every non-host plants tested, the internal population sizes of the strain *XccΔcheY* were higher than those of the wild type (Fig. 2H, 2I, 2J). This phenotype was significantly different for the deletion mutant on tomato five dpi and was restored by complementation. This result suggests that CheY allowed *Xcc* strain ATCC 33913 to avoid

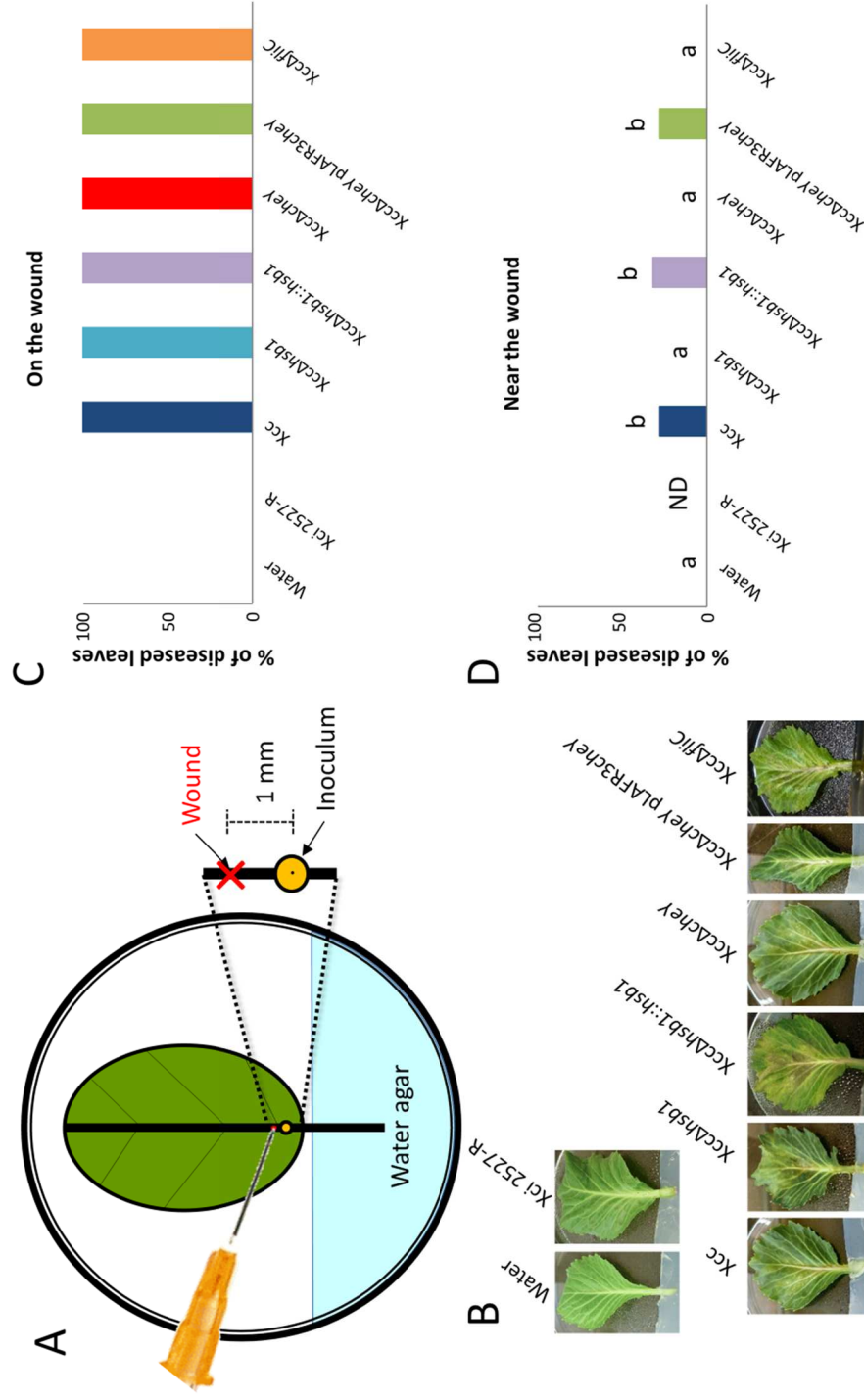


FIG 3 Chemotaxis-dependent pathogenicity tests of Xcc ATCC 33913, mutants and complemented mutants on cabbage. (A) Detached cabbage leaves were inserted in 0.7% agar water. Midrib of leaves were wounded with a needle. A drop (10 μ l) of bacterial suspension at 5×10^8 CFU/ml in 0.2% agar water was deposited either on the wound or near the wound, *i.e.* at 1 mm of the wound. Petri dishes containing leaves were incubated in a growth chamber under 16 h of light at 25°C and 8 h of darkness at 25°C. Water and Xci 2527-R were inoculated on 4 leaves, whereas 8 to 14 leaves were inoculated for other strains in 2 to 4 independent experiments. Rotting of midrib and spreading (B) was notated on leaves 7 dpi of Xci 2527-R, Xcc ATCC33913, XccΔhsb1, XccΔhsb1 pLAFR3cheY, XccΔcheY, XccΔcheY::hsb1, XccΔhsb1::hsb1, and XccΔflc for inoculum deposited directly on the wound (C) or 1 mm away from the wound (D). In (D) different letters refer to significantly different groups based on the post-hoc analysis.

internalization in non-host plants tissues. Altogether, chemotaxis favoured the entry of *Xcc* strain ATCC 33913 in *A. thaliana* leaf tissues and conferred an optimal fitness to this strain on radish, while it restricts *Xcc* on the surface of non-host plants (Fig. 2).

Hsb1 promotes bacterial ingress into host leaves. To test the role of Hsb1 in the bacterial entry into host tissues, we quantified the population dynamics of the mutant deleted from this gene, *XccΔhsb1*, in host and non-host plant leaves. *Xcc* strain ATCC 33913, *XccΔhsb1* and *XccΔhsb1::hsb1* populations multiplied in *A. thaliana* phyllosphere (Fig. 2A). There were no significant differences among total population sizes of these strains up to five dpi. However, *XccΔhsb1* displayed internal population sizes that were 10 times lower than those of the wild-type strain (Fig. 2A). This indicates a lack of internalization for populations of *XccΔhsb1* up to five dpi in *A. thaliana* leaves. Upon complementation of the mutant, the original phenotype was restored. The behavior of this mutant on radish was not different from the wild-type strain. In contrast, total population sizes of *Xcc* strain ATCC 33913, *XccΔhsb1* and *XccΔhsb1::hsb1* remained constant on non-host plants of *Xcc* strain ATCC 33913. The internal population sizes of *XccΔhsb1* in leaves of the two non-host plants, stock and tomato, were significantly higher (around five and 25 times, respectively) than those of the wild-type strain (Fig. 2C and 2D). The same trend was observed on bean (Fig. 2E). The behavior of wild-type strain was restored upon complementation of the mutants on stock and tomato (Fig. 2C, 2D, 2E). Thus, Hsb1 is important for the internalization of *Xcc* strain ATCC 33913 in leaf tissue of host plants, while limiting *Xcc* strain ATCC 33913 entry into leaf tissues of non-host plants.

A wound in the midrib of cabbage leaf is attractive for *Xcc*. We thus hypothesized that Hsb1 is involved in the sensing of attractive(s) substance(s) from host plants of *Xcc* strain ATCC 33913. A pathogenicity assay, in which the bacterium should depend on chemotaxis to reach favorable sites of entry was developed (Fig. 3 and Fig. S2 in supplemental material).

Table 1: Chemotactic responses of *Xcc*, *XccΔhsb1*, and *XccΔhsb1::hsb1* to leaf extracts. A capillary assay was used to test the effect of leaf washings, leaf grindings, and intercellular washing fluids (IWFs). Bacteria, which were retrieved in the capillary disposal were quantified by dilution plating. The values indicate per strain the ratios between the size of the bacterial population with the tested leaf extract to the size of the bacterial population with water. Different letters indicate significant differences between strains for tested molecule based on the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). For the complete set of data please refer to Fig. S1 in the supplementary material.

	<i>Xcc</i>	<i>XccΔhsb1</i>	<i>XccΔhsb1::hsb1</i>	Ratio <i>Xcc</i> / <i>XccΔhsb1</i>
Leaf washings				
Arabidopsis	1.9 (a)	0.6 (b)	1.0 (ab)	3.1
Cabbage	1.0 (b)	0.8 (ab)	2.0 (a)	1.3
Radish	1.7	0.6	1.2	2.9
Tomato	0.5	0.9	0.6	0.5
Bean	0.4 (b)	2.7 (a)	0.8 (b)	0.1
Stock	0.8 (b)	1.6 (ab)	1.8 (a)	0.5
Leaf grindings				
Arabidopsis	14.9	7.9	15.2	1.9
Cabbage	11.5	11.6	12.1	1.0
Radish	31.9	16.6	25.9	1.9
Tomato	17.5	37.2	23.6	0.5
Bean	20.5	14.1	15.2	1.4
Stock	9.9 (b)	36.0 (a)	16.4 (ab)	0.3
Intercellular washing fluids				
Arabidopsis	5.7	2.3	4.8	2.5
Cabbage	6.5	4.5	7.5	1.4
Radish	9.5	8.4	10.4	1.1
Tomato	3.0 (b)	12.3 (a)	3.4 (b)	0.2
Bean	4.6 (a)	4.4 (a)	1.6 (b)	1.1
Stock	0.6 (b)	1.8 (a)	1.1 (ab)	0.3

The midribs of detached leaves of cabbage were wounded with a needle and one drop of a bacterial suspension was inoculated 1 mm away from the wound or directly on it. In the presence of attractants, chemotaxis should trigger bacterial motion towards the wounds and subsequent penetration within the vein, which will result in degradation of plant tissues. In absence of attractants, no symptom development is expected. It was previously checked that the inoculum deposit on an unwounded midrib does not lead to symptom development. Control leaves inoculated with water did not present any symptoms (Fig. 3). All leaves for which *Xcc* strain ATCC 33913 and *XccΔhsb1*, *XccΔcheY* and *XccΔfliC* mutants were inoculated directly on the wound caused similar black rot symptoms (Fig. 3). This indicates that strain growth is similar once inside leaf tissues. Leaves inoculated with Xci 2527-R presented no symptoms. In contrast, when a drop of *Xcc* strain ATCC 33913 suspension was inoculated 1 mm away from the wound, around 30% of samples developed disease symptoms. The mutants *XccΔhsb1*, *XccΔcheY* and *XccΔfliC* inoculated at the same distance did not induce any symptoms in any of the leaves (8 to 14) inoculated with each strain. The wild-type phenotype was restored by the complementation of the mutants. Altogether these results indicated that Hsb1 is essential for the recognition of (an) attractive molecule(s) diffusing from the midrib wound of host plant allowing attraction of motile *Xcc*, which upon ingress into leaf tissue induces disease.

Hsb1 detects attractive signal(s) from host plants. The attraction of three types of leaf extracts, such as leaf washings (LWs), leaf grindings (LGs) and intercellular washing fluids (IWFs) from hosts and non-hosts plants was tested for *Xcc* and *XccΔhsb1* with a capillary assay. In this assay bacteria move toward higher concentrations of the attractive molecules, which are found in the needle. Quantification of bacterial cells in the needle filled in with the solution to be tested revealed that Hsb1 was clearly involved in the attraction of *Xcc* by LWs of *Arabidopsis* ($p < 0.05$) and in the repulsion of *Xcc* by LWs of bean, LGs of

Table 2: Chemotactic responses of *Xcc*, *XccΔhsb1*, and *XccΔhsb1::hsb1* to various molecules in capillary assay. Bacteria, which were retrieved in the capillary disposal were quantified by dilution plating. Values indicate per strain the ratio between the size of the bacterial population with the tested molecule to the size of the bacterial population with water. Different letters indicate significant differences between strains for tested molecule based on the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). For the complete set of data please refer to Fig. S3 in the supplementary material.

	<i>Xcc</i>	<i>XccΔhsb1</i>	<i>XccΔhsb1::hsb1</i>	Ratio <i>Xcc/XccΔhsb1</i>
Sinigrin	4.2 (a)	0.5 (b)	3.4 (a)	8.5
L-Glutamic acid	1.6 (a)	0.6 (ab)	0.3 (b)	2.5
L-Histidine	1.4 (ab)	0.6 (b)	3.7 (a)	2.2
L-Isoleucine	2.1 (a)	0.8 (ab)	0.4 (b)	2.7
L-Phenylalanine	5.1 (a)	0.8 (b)	3.5 (a)	6.5
L-Serine	3.9 (ab)	1.3 (b)	4.5 (a)	3.0
Acetic acid	0.9 (a)	0.2 (b)	0.2 (b)	3.6

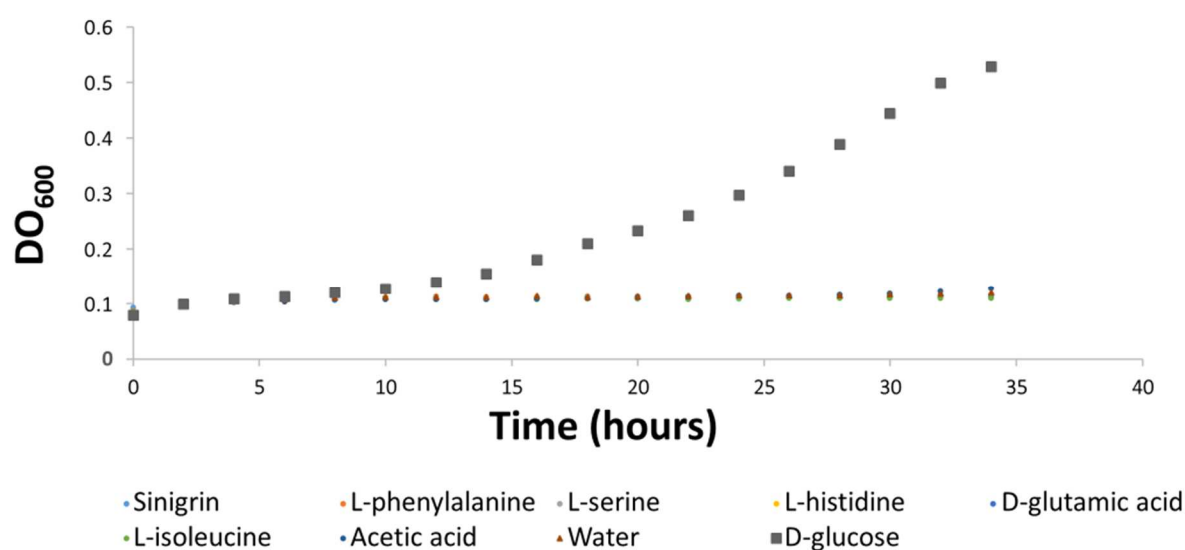


FIG 4 Growth curves of *X. campestris* pv. *campestris* strain ATCC 33913 in minimal medium (MME) supplemented with sinigrin, L-phenylalanine, L-serine, L-histidine, L-glutamic acid, L-isoleucine, acetic acid, D-glucose or water. Molecules were concentrated at 10 mM.

stock and IWFs of tomato and stock (Table 1). Hsb1 tended to sense attractant from brassicas and repellent from non-host plants. While every host LG was attractive to *Xcc*, the MCP Hsb1 limited the *Xcc* attraction to LGs of stock (Table 1 and Fig. S1 in supplemental material). In a same way, Hsb1 contributed to a slight attraction of IWFs of all three brassicas tested but Hsb1 limited significantly the attraction of *Xcc* to IWFs of tomato and stock (Table 1 and Fig. S1 in supplemental material).

Hsb1 detects sinigrin and L-phenylalanine. To get a better idea of molecule that Hsb1 could detect, a capillary assay was settled. Sinigrin -a glucosinolate-, L-phenylalanine, L-serine, D-fructose, D-galacturonic acid, D-glucose, and D-xylose solutions were more attractive for *Xcc* than water (Table 2, Fig. S3 in the supplemental material). In contrast, D-gluconic acid, itaconic acid, and ethephon solutions were considered as repulsive for *Xcc*. *Xcc* concentrations were indeed lower in the needle than for water (Fig. S3 in the supplemental material). *XccΔhsb1* was significantly impaired in its capacity to be attracted by sinigrin, L-phenylalanine and acetic acid as *XccΔhsb1* concentrations were significantly lower than that of the *Xcc* wild type strain (Table 2 and Fig. S3 in supplemental material). Phenotype was fully restored following complementation of the mutant for sinigrin and L-phenylalanine, restoration was partial for acetic acid. For other molecules such as L-histidine and L-serine attraction was noticed but was not statistically significant.

Sinigrin and L-phenylalanine are not metabolized by *Xcc*. To test if taxis toward sinigrin and L-phenylalanine was metabolism-dependent, the growth curve of *Xcc* in minimal medium complemented with these chemicals as unique carbon sources was tested. As expected (38), the DO₆₀₀ of *Xcc* in positive control medium (MME supplemented with 10 mM glucose) increase with the time indicating glucose metabolism leading to bacterial multiplication. In the same conditions, however, the DO₆₀₀ of *Xcc* remains stable when

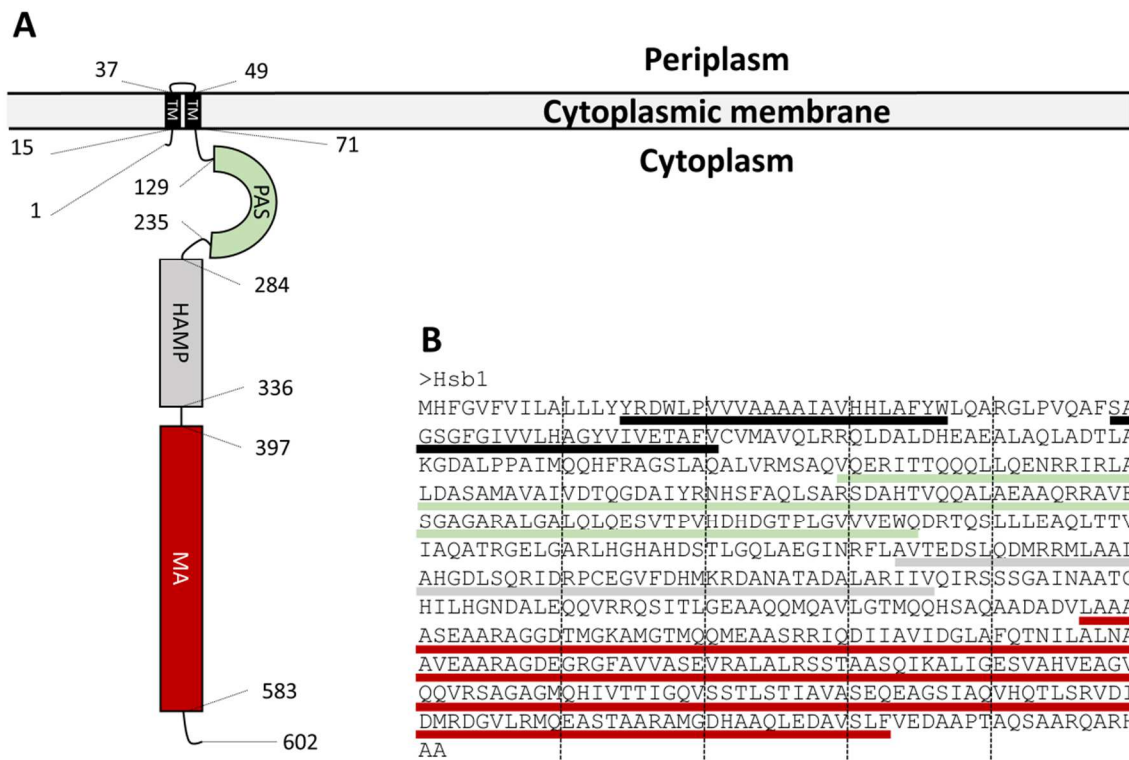


FIG 5 Predicted structure of Hsb1. (A) Using InterProScan software, two transmembrane (TM) regions, a Per-Arnt-Sim (PAS) domain, a Histidine kinase–Adenylyl cyclase–Methyl-accepting chemotaxis protein–Phosphatase (HAMP) domain, and a Methyl-Accepting (MA) domain were predicted the protein sequence of Hsb. Numbers represent the coordinates of different regions and domains in the protein. (B) Protein sequence of Hsb1. Colors represent the same domains and regions of the part A of this figure.

sinigrin and L-phenylalanine were provided (Fig. 4). This behavior was independent of Hsb1 and of light (data not shown).

Hsb1 has a cytosolic PYP-like superfamily sensor domain. Based on InterProScan predictions, Hsb1 has two transmembrane regions at the N-terminus followed by a cytoplasmic PAS-type sensor domain, a HAMP domain and a MA domain (Fig. 5). This PAS domain belongs to the PYP-like superfamily. PYP-like superfamily contains seven families of proteins including sensory proteins involved in oxygen or light sensing through different kind of binding sites. Hsb1 sensory domain did not seem to belong to any of these families according to InterProScan research. PAS domain of Hsb1 is closest PYP-like domain (SCOP55785), than to any other domain of this superfamily. PYP-like domain was first identified in a photoactive yellow protein (PYP) from *Halorhodospira halophila* (4). Three residues are essential for the interaction with the cofactor 4-hydroxycinnamic acid, conferring sensitivity to blue/near-UV light. None of these residues are conserved in Hsb1. Altogether this suggests that Hsb1 sensory PAS domain corresponded to a new type of PAS domain. The cytosolic localization of Hsb1 PAS domain indicated that sinigrin and L-phenylalanine should be indirectly sensed after a preliminary step generating a cytoplasmic energy signal.

No evidence of elicitation of tomato defense reaction by Hsb1. The deletion of *hsb1* led to high internal population sizes of *Xcc* strain ATCC 33913 in non-host plants. This observation could mean that Hsb1 is a potential microbe-associated molecular pattern (MAMP) eliciting plant defense responses. Therefore detection of this MAMP by non-host plant would induce plant defense reactions and limit bacterial ingress, whereas for *XccΔhsb1*, non-host defense reactions would be lower than with the wild type. To test this hypothesis, elicitation of 26 genes representing the main defense pathways and layers of plant defense reactions was tested on tomato by qRT-PCR using qPFD (39). Tomato leaves were collected 2, 8 and 24 h after vacuum-infiltration of water, *Xcc* strain ATCC 33913, *XccΔhsb1*, and

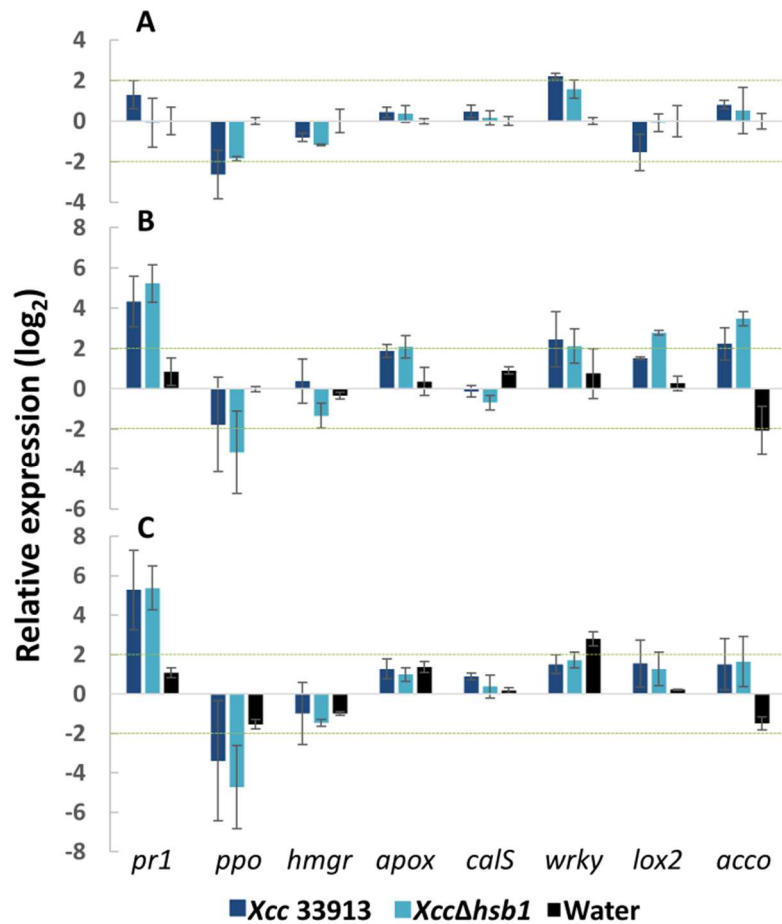


FIG 6 Relative normalized expression of 8 defense genes in tomato leaves after bacterial strain infiltration. Tomato leaves were vacuum-infiltrated with 1×10^7 cfu/ml suspensions of *Xcc* ATCC 33913, *XccΔhsb1*, and water as negative control. Samples were taken 2 (A), 8 (B) and 24 h (C) post inoculation. qRT-PCRs were performed in 96-wells plates containing dehydrated primers of triplicate sets of 26 defense genes, three reference genes and one negative control (see Fig. S2 for complete set of results). Expression values were calculated with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Dotted bars represent a 4-times induction or repression relative to the negative control. The mean of water treatment values sampled 2 h post inoculation was used for calibration at each sampling date, and the geometric mean of values obtained for internal controls (*gapdh*, *actin2*, and *tuA*) was used to normalize each sample. Means and SEM were calculated for data from two independent experiments, each containing two replicates per sample. For the complete set of data please refer to Fig. S4 in the supplementary material.

*Xcc*Δ*hsb1*::*hsb1* and the relative expression of defense genes was calculated in comparison to the water-infiltrated leaves collected 2 h after inoculation to follow the dynamic of plant defense reaction (Fig. 6; Fig. S4). No significant differences in defense-related gene expression were observed in tomato leaves even 24 h after vacuum-infiltration of the three bacterial strains. The genes *pr1* and *pr4* were strongly induced by the three strains, whereas *ppo* gene expression was repressed by all the strains. The expression of the 23 other genes was only slightly modified upon inoculation of any of the three strains. The isoprenoid pathway genes (*hmgr*, *fpps*, *far*) showed relative expression nearly identical to the reference. A slight transient induction of oxidative stress genes (*apox*, *gst*, *pox*) independent of the inoculated strain was monitored 8 h after inoculation. The expression of genes encoding protein involved in cell-wall modification (*calS*, *pect*, *cad*) was not significantly modified by any strain. Genes of the salicylic acid pathway were slightly induced from 2 h after inoculation via the WRKY30 transcription factor. Induction of *lox2* and repression of *jar* from jasmonic acid pathway were noticed from 8 h after inoculation. The gene *acco*, one of the two markers of the ethylene pathway, was induced from 8 h after inoculation. These results suggest that Hsb1 does not elicit tomato defense reactions.

DISCUSSION

Xanthomonas are plant pathogenic bacteria attacking the aerial parts of plants (40). Most pathogenic strains of *Xanthomonas* are characterized by a restricted host range, generally limited to one or few species of plants. *Xcc* is one of the few xanthomonads to have a wide host range, which nearly embraces the *Brassicaceae* family. Xanthomonads reach the plant surface essentially through contaminated aerosols, contact with neighboring plants, and from the contaminated seeds. As bacteria have no specific structures to force entry into plant tissues, they must therefore detect natural penetration sites, such as stomata and hydathodes or

wounds to reach the intercellular spaces and/or vascular vessels, in which they can multiply. Here based on the phenotyping of strains deleted in one chemosensor, Hsb1, and in CheY a key chemotaxis signal transducer we demonstrated the role of chemoattraction in leaf ingress and host specificity of *Xcc*. Analysis of *XccΔcheY* behavior indicated that transduction of the chemotactic information was requested for an efficient internalization into leaf tissues of host plants, such as radish and *A. thaliana*. Such a role of chemotaxis in the ingress inside plant tissues was already demonstrated for some bacterial pathogens, such as *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum* and *Dickeya dadantii* (11, 14, 41, 42),

The MCP Hsb1 detects attractive environments leading to the ingress of the bacterium in host plants. Attractive signals were perceived in leaf washings, but also in leaf grindings and in intercellular washing fluids. We clearly show that the ingress of *Xcc* deleted from *hsb1* is far less efficient in host plant tissues than for the wild-type. It was observed that Hsb1 also detects repulsive environments leading to *Xcc* confinement on the leaf surface of non-host plants. In capillary assays, Hsb1 sensed leaf washings of *Arabidopsis* (host plant) as attractive, whereas leaf washings of bean (non-host plant) were sensed as repulsive. Opposite tendencies were obtained for the mutant deleted of *hsb1*, indicating that this sensor is involved in this chemotactic behavior. Behavior of the wild type and the mutant were not always significantly different. However, overall, Hsb1 tended to sense attractants from brassicas and repellents from non-host plants. The lack of significantly different behaviors of strains towards some plant extracts, originated from different plant compartments, could be due to the presence of various components, which may have various effects on bacteria. Capillary assays with pure molecules would be more appropriate to assay chemotaxis. Using the pathogenicity test involving chemoattraction that we designed, we showed that the *Xcc* requires *hsb1* to detect the wound and get entry into tissue to engage in pathogenicity relationships with the host. No differences in symptoms could be observed among the wild-

type and the mutant strains when inoculated on the wound demonstrating that Hsb1 is responsible for attraction but has no role in bacterial *in planta* growth. *Xcc* being attracted at plant wounds, we tested the effect of sinigrin on Hsb1. Sinigrin is an aliphatic glucosinolate liberated upon cell breakage in various brassicas (43, 44). This molecule together with L-phenylalanine attracted *Xcc* through Hsb1. The attraction of bacterial pathogen by plant molecules synthesized at wounding sites was already reported in several case. For instance, jasmonate, which is synthesized in wounded tissues is a strong attractant for *Dickeya dadantii* and induces the spread of the bacteria through the leaf surface (14). Proline exuded by *Medicago sativa* seeds attracts its symbiont, *Sinorhizobium meliloti* through the chemoreceptor McpU (45). Low O₂ concentration found in xylem vessels together with high concentration of oxidants such as H₂O₂ are stresses perceived by StoS, a hybrid-type histidine kinase sensor of *X. oryzae* pv. *oryzae* that mediates stress tolerance and virulence on rice (46).

Altogether the behaviors of *XccΔcheY* and *XccΔhsb1* support the idea that recognition of host and non-host plants occurs at the entry of *Xcc* into leaf tissues. These results experimentally validate those obtained by Mhedbi-Hajri and colleagues, (2011), who showed a correlation between pathovar clustering and repertoires of sensors and adhesins and strong evidence of adaptive divergence acting on most genes encoding sensors and adhesins. These three sets of complementary results indicate that the repertoire of MCPs and especially Hsb1 is responsible for the recognition of specific metabolites and determination of host range. Our results suggest that Hsb1 detects multiple molecules. Several MCPs have already been shown to detect different molecules (47–49). The dependence on chemotaxis to direct colonization of preferred niches has been demonstrated for human pathogens such as uropathogenic *E. coli* in the urinary tract (48), *Vibrio cholera* in the deep crypts of the small intestine (50) and *Campylobacter jejuni* in the mucus of the gastric epithelium (49, 51). It has also been demonstrated for the plant pathogen *R. solanacearum*, which uses aerotaxis to quickly find

the roots of its host plant to initiate colonization (11, 52), and *D. dadantii*, which locates plant entry sites through the emission of jasmonic acid at wounded sites (14).

From a structural point of view, the PAS sensory module being cytoplasmic Hsb1 should detect signals that can cross the cytoplasmic membrane or that are generated in the cytoplasm. Among this latter category are signals related to the redox and/or intracellular energy status of the cell, which include light, terminal electron acceptors, metabolizable substrates and redox-active compounds (53). While being relatively close to PYP-like domain, the sensor domain of Hsb1 is apparently not involved in light signaling as reported by Mao and colleagues (2012) (54) and by our experiments (data not shown). No homology to heme pockets could be identified within the PAS domain suggesting that O₂ is not a signal sensed by Hsb1. The attractants identified for Hsb1 are not metabolized by *Xcc* eliminating also this possibility as signal. The signals detected by Hsb1 could be weak acids, or redox-active compounds such as oxidized quinones that can cross the membrane or act as redox-active compounds, respectively (53). Such possibilities should be tested to solve the question of the signal perceived by Hsb1. MCPs containing cytoplasmic PAS domains are classified as Aer, AerC or energy-taxis receptor containing a generic PAS domain (53, 55). Hsb1 exhibits a new structure, in which no periplasmic domain has been predicted and in which the cytoplasmic PAS domain is followed by a HAMP and a MA domain.

Recent RNAseq experiments have shown that every MCP-encoding gene was expressed in the wild-type *Xcc* strain 8004 (Roux and Noël, unpublished data). Moreover, the *hsb1* orthologous gene in this strain, *XC_0336*, is the only gene encoding a MCP to be up-regulated in a strain containing a phosphorylated HrpG that mimic activating conditions. HrpG is a Two-Component-Regulator acting upstream of several major pathogenicity factors (56). This suggests that the basal expression of *hsb1* would allow the presence of the sensor bound to the membrane and that upon detection of a plant signal, the number of sensors would be increased

Table 3. Strains and plasmids used in this study.

Strains or plasmids	Characteristics	References
Plasmids		
pΔ13	Derivated from pK18mobsacB, <i>sacB</i> , <i>oriT</i> (<i>RP4</i>), <i>pBM1ori</i> , <i>ccdB</i> , <i>Cm^r</i>	Guy et al., 2013
pRK600	<i>Cm^r</i> , <i>traRK2</i> , <i>oriColE1</i>	Finan <i>et al.</i> , 1986
pLAFR3	<i>Tc^r</i> ; <i>Tra</i> -, <i>Mob</i> +, <i>cos</i> , RK2 replicon	Staskawicz <i>et al.</i> , 1987
Bacterial strains		
<i>Xcc</i> ATCC 33913	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> wild-type ATCC 33913; <i>Rif^r</i>	da Silva <i>et al.</i> , 2002
<i>Xci</i> 2527-R	<i>X. campestris</i> pv. <i>incanae</i> 2527-R; <i>Rif^r</i>	Kendrick and Baker, 1942
DH5α	<i>E. coli</i> F f980dlacZ:M15 <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (rK- mK+) <i>supE44relA1 deoR</i> (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Hanahan, 1983
K12	<i>E. coli</i> (helper)	Devoret and Blanco, 1970
<i>XccΔfliC</i>	ATCC33913Δ <i>XCC1941</i> , <i>Rif^r</i>	This study
<i>XccΔcheY</i>	ATCC33913Δ <i>XCC1905</i> , <i>Rif^r</i>	This study
<i>XccΔcheY</i> pLAFR3 <i>cheY</i>	ATCC33913Δ <i>XCC1905</i> pLAFR3 <i>XCC1905</i> , <i>Rif^r</i> , <i>Tc^r</i>	This study
<i>XccΔhsb1</i>	ATCC33913Δ <i>XCC0324</i> , <i>Rif^r</i>	This study
<i>XccΔhsb1::hsb1</i>	ATCC33913Δ <i>XCC0324::XCC0324</i> , <i>Rif^r</i>	This study

allowing a more efficient chemotactic response. These results are consistent with those showing the up-regulation of a number of genes involved in motility and chemotaxis in *X. oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola* in minimal medium mimicking the pH and the nutrient content of the apoplast (57).

Could the differential behavior observed between the wild type and the mutant strain deleted of *hsb1* be a consequence of a differential perception by plant receptors? We have no evidence that Hsb1 is an elicitor of plant defense reactions in non-host tomato. In host plants, type three effectors could have suppressed plant defense reactions elicited by Hsb1. Hence, the MCP Hsb1 is not detected as a MAMP and should not participate in activation of plant immunity.

In summary, we demonstrated that Hsb1 detected a host plant signal as attractant. In contrast, non-host plants were sensed as repulsive environments by Hsb1. Chemotaxis through CheY was involved in host specificity of *Xcc* ATCC 33913 allowing this strain to transfer the signal detected by MCPs to the flagellum allowing an optimal fitness on radish (host plant), a better internalization of *Xcc* strain ATCC 33913 in *A. thaliana* tissues and limiting the internalization in non-host plants (tomato, stock and bean). Hsb1 detected, probably indirectly, sinigrin and L-phenylalanine as attractive molecules. Identifying the signal that allow the tropism of *Xcc* to sites of entry in *Brassicaceae* will help designing control methods active on this plant pathogen.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. Strains used and constructed during this work are listed in Table 3. Strains were grown on 10% TSA medium (tryptone at 1.7 g/l, soybean peptone at 0.3 g/l, glucose at 0.25 g/l, NaCl at 0.5 g/l, K₂HPO₄ at 0.5 g/l, and agar at 15 g/l) supplemented with cycloheximide at 50 mg/l and propiconazole at 10 mg/l to inhibit fungal

growth and appropriate antibiotics. Antibiotics were used at the following concentrations: rifamycin (Rif) at 50 mg/l, rifampicin (Rifp) at 50 mg/l, kanamycin (Km) at 25 or 50 mg/l and tetracyclin (Tc) at 10 mg/l. *Xanthomonas* strains were cultivated at 28°C and *Escherichia coli* strains were cultivated at 37°C during 24 h. Every strain was conserved at -80°C in 40% glycerol solution.

Mutagenesis techniques to construct mutants of *Xcc* strain ATCC 33913. Deletion mutants were obtained using the « *sacB* » method with the pΔ13 plasmid, a Golden Gate derivate of pK18mobsac (58). This method allows the scarless deletion of the gene from the start to the stop codons (Tables 2 and 3). The 5' and 3' regions were PCR-amplified with Taq Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Fisher Scientific, Illkirch, France). A mix of amplified fragments and plasmid were simultaneously digested with BsaI (Fermentas, Villebon sur Yvette, France) and ligated with T4 DNA ligase (Promega, Charbonnière, France) in T4 DNA ligase buffer (59). This mix was incubated in a thermocycler using the following program: 37°C and 16°C during 5 and 2 min respectively for 25 cycles; 50°C during 10 min and 65°C during 15 min. Products were cloned into *E. coli* DH5α (60) and transferred in recipient *Xcc* strain ATCC 33913 by triparental mating using the mobilizing *E. coli* K12 (pRK600) (61, 62). Gene was deleted following the selection of several recombination events as described in (63).

Complementation of deletion mutants. Trans-complementation of mutants were performed with pLAFR3 (64). Primers encompassing the target gene were designed to include restriction sites suitable for pLAFR3 (Table 1 and Table S1). PCR products were digested with EcoRI and HindIII (Fermentas, Villebon sur Yvette, France) and ligated into the pLAFR3 plasmid behind the constitutive promoter *placZ*. The resulting pLAFR3 vectors were introduced in *Xcc* by triparental mating, as described above. Transconjugants were selected on MOKA medium with appropriate antibiotics.

For complementation of mutants *in cis* using p Δ 13, i.e. introducing the gene at deletion site, primers (Table S1) were designed to amplify the target gene and about 500 bp of the 5' and 3' flanking regions of the gene. Plasmids and PCR fragments were *Bsa*I digested and ligated. Then, the construction was introduced in *Xcc* Δ *hsbI* electrocompetent cells by electroporation. Electrocompetent cells were prepared according to (65). Electroporation was performed at 2.45 kV, 25 μ F, 200 Ohm (66). Mutants were selected using the «*sacB*» method with the p Δ 13 plasmid previously described. As a result the gene was inserted back in its original location.

Regions containing the deletions and the complementations were PCR amplified (Table 3) and sequenced to validate the constructions. To assess that deletions and complementations had no impact on *in vitro* growth, growth curves were established for each mutant and the wild-type strain *Xcc* strain ATCC 33913 according to (36).

Motility tests. Strain motility was tested in soft-agar assays. Xanthomonad strains were grown at 28°C up to 12 days in MOKA (yeast extract 4 g/l; casamino acids 8 g/l; KH₂PO₄ 2 g/l; MgSO₄·7H₂O 0.3 g/l) medium containing 0.2% agar and 0.05% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. A 10 μ l drop of a 1 x 10⁸ cfu/ml suspension is deposited in the middle of the plate and the radius of the colony measured every two days and imaged at five days.

Plant material. Bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Flaver), radish (*Raphanus sativus*, cv. Kocto), tomato (*Lycopersicum esculentum* cv. Super Marmande), Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* ecotype Sf-2), cabbage (*Brassica oleracea* cv. Bartollo), and stock (*Matthiola incana* cv. Mammouth Excelsior) were grown in Neuhaus humin substrat S NF 11-44-551 (Proveg, La Rochelle, France) in growth chamber under 16 h of light at 23°C and 8 h of darkness at 20°C for every plants except *A. thaliana* plants, which were grown under 16 h of light at 22°C and 8 h of darkness at 19°C. Plants were watered three times per week, and once a week,

water was supplemented with 0.3 g/L nitrogen-phosphorous-potassium fertilizer (18:14:18). One day before inoculation, plants were transferred in growth chamber under 16 h of light at 25°C and 8 h of darkness at 20°C and under high relative humidity (95%). Three independent experiments were conducted.

Sterilization of the leaf surface and *in planta* dynamics of bacterial population sizes. The dynamics of bacterial population sizes were measured in the phyllosphere of host plants (2-weeks-old radish and 5-weeks-old *A. thaliana*) and non-host plants (5-weeks-old stock, 2-weeks-old bean at the V2 stage (67) and 4-weeks-old tomato). Plants were spray inoculated until runoff with bacterial suspensions at 1×10^6 CFU/ml. Leaves (the first or second true leaf for the radish, two leaves from the *A. thaliana* rosette, 2 leaves of stock (the fourth and fifth leaf stages), one leaflet of the first trifoliate leaf of bean, two leaflets of the 3rd leaf of tomato) were sampled 3 hours, 1 and 5 days after inoculation on five plants. To kill epiphytic bacteria at 1 and 5 days after inoculation, we performed a chloroform surface disinfection as previously described (37). Samples were weighed and grinded (Stomacher 80; Seward, London, United Kingdom) for 2 min, 120 Hz in 5 ml of sterile distilled water. Samples were diluted and 50 μ l drops were plated on TSA 10% with appropriate antibiotics to enumerate the inoculated strain after 3 days incubation at 28°C. Five plants were sampled per treatment at each sampling dates. All experiments were independently conducted at least three times.

Leaf extracts. Three types of leaf extracts were used as sources for capillary assays: leaf washings (LWs), leaf grindings (LGs), and intercellular washing fluids (IWFs). A sample was constituted by two young leaves of Arabidopsis, the fourth leave of cabbage, the first and second leaves of radish, the third leave of tomato, the second leaflet of the V2 stage of bean, or two young leaves of stock. Samples were harvested from six plants per experiment. For LWs leaves were gently agitated for 30 sec in 10 ml of ultra-pure H₂O (Eurobio, Molecular

477 Biology Grade). For LGs, washed leaves were grinded (Stomacher 80; Seward, London,
478 United Kingdom) for 2 min, 120 Hz in 5 ml of ultra-pure H₂O. IWFs were extracted as
479 described in (68) with the following modifications. Leaves were cut off from the petiole and
480 vacuum infiltrated during the 3 min with the extraction buffer (100 mM Tris, 100 mM KCl,
481 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.01% (vol/vol) triton X-100, pH 7.0).
482 Infiltrated leaves were gently dried using paper towels. Distal parts of leaves were cut off and
483 leaves were carefully rolled in centrifugation tube with plastic mesh set about 0.5 cm above
484 the bottom. Centrifugation were performed at 4°C, during 20 min at 2000 g. After extraction
485 every plant source was frozen in liquid nitrogen and stored at – 80°C.

486 **Chemical solutions.** Solutions of sinigrin, L-alanine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-
487 glutamic acid, L-histidine, L-isoleucine, L-phenylalanine, L-serine, D-fructose, D-
488 galacturonic acid, D-gluconic acid, D-glucose, D-maltose, D-sucrose, D-xylose, glycerol,
489 acetic acid, itaconic acid, methyl-salicylic acid (MeSA), methyl-jasmonic acid (MeJA), and
490 ethephon (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) were concentrated at 10 mM in
491 ultra-pure water (Eurobio, Molecular Biology Grade) for capillary assays and in MME for
492 metabolization experiments.

493 **Capillary chemotaxis assay.** Chemotaxis was measured by a slightly modified
494 version of the method of (69). A needle (0.5 × 16 mm, 25G × 5/8” Terumo, Belgium)
495 attached to a 1 ml syringe (Terumo, Philippines) was filled up to 200 µl by the solution to
496 test, named the “source”. The needle-syringe was inserted into a 200 µl pipette tip (Sorenson,
497 Utah) containing 120 µl of a fresh bacterial suspension at 1×10^8 cfu.ml⁻¹. To ensure a leak-
498 proof assay, the tip was put into a cap. Then, this capillary assay was incubated horizontally
499 for 30 min at room temperature. The source was retrieved and diluted to enumerate bacteria
500 by dilution –plating on 10% TSA Rif. Colony enumeration was performed after three days of

incubation at 28°C. Five technical repetitions and three biological repetitions were performed per condition.

Chemotaxis test on wounded cabbage leaves. The 4th leaves of 5-weeks-old cabbages were detached and inserted in water-agar (0.7% of agar) in Petri dishes. The midrib of the leaves was wounded with a needle and 10 µl of an inoculum at 5×10^8 cfu/ml was deposited 1 mm away from the wound or directly on it (Fig. 3A). Leaves were incubated in a water-saturated growth chamber under 16 h of light at 25°C and 8 h of darkness at 25°C. The length of the rot was scored from 6 to 14 days after inoculation.

Bacterial growth curves to assess metabolization of molecules. To assess if molecules are metabolized by the bacterial strains at an initial concentration of 1×10^7 cfu/ml, growth curves were established in minimal medium (MME (70), supplemented with 10 mM of the tested molecule. For positive control, MME was supplemented with 10 mM of glucose. Inoculated solutions in 100-well honeycomb microtiter plates (Thermo Electron, Courtaboeuf, France) were incubated at 28°C with continuous shaking over a period of 34 h until the start of the stationary phase. Growth measurements were monitored automatically every 2 h by optical density measurements at 600 nm using the Bioscreen C instrument (Labsystems, Helsinki, Finland). Three technical and two biological repetitions were done for each strain.

Quantification of tomato defense reactions. A bacterial suspension at 1×10^7 cfu/ml was vacuum-infiltrated in four weeks old tomato leaves. Leaves were sampled 2, 8 and 24 h after inoculation. On the same plant, 2 leaflets of the 4th leaf were grounded for the RNA-extraction. The remaining parts of the 3rd and the 4th leaves were weighed and grounded to quantify the bacterial population sizes. RNAs were extracted using the NucleoSpin® RNA plant kit (Macherey-Nagel), quantified with a NanoDrop spectrophotometer (ThermoScientific, Illkirch, France) and RNA concentrations were adjusted to 0.5 µg/µl. RNA solutions were stored at -80°C until reverse transcription. The absence of sample

contamination by DNA was checked as previously described (71). Reverse transcription was performed according to (72). Quantitative amplifications were performed in 96-wells plates containing dehydrated primers of triplicate sets of 26 defense genes, three reference genes and one negative control (39) in iCycler Thermo Cyclor (Biorad). Relative changes in gene expression were calculated by using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (73), normalized to the three internal controls (reference genes), and relative to a calibrator (control samples treated with H₂O sampled 2 h after inoculation).

Statistical analysis. Log₁₀-transformed data were analyzed with Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U-test (74) using the software R (<http://www.r-project.org/>). Data from experiments aimed at determining the strain capacity to infect the cabbage leaves was analyzed using Generalized Linear Models (GLM) with binomial error distributions and the logit link function (75). Data from four independent experiments were pooled in the statistical analysis. This analysis was performed using the software R and the best model was selected using the Akaike Information Criterion (AIC) (76).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Figure S1, PPTX file, 1.3 MB.

Figure S2, PPTX file, 0.04 MB.

Figure S3, PPTX file, 1.3 MB.

Figure S4, PPTX file, 0.8 MB.

Table S1, DOCX file, 0.02 MB.

ACKNOWLEDGEMENTS

Arnaud Indiana is funded by a PhD grant from INRA-SPE and La Région Pays de la Loire, France. This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche

(XanthomiX, ANR-2010-GENM-013) and by the AIP Bioressources project Taxomic (2012). The authors gratefully acknowledge Brice Roux for providing RNAseq data, Claudine Zischek for sharing mutagenesis protocol, INEM team and particularly Sylvain Hanteville, Joël Benard and Nicolas Dousset for technical assistance in growth chamber maintenance and plant production, Odrade Nougé and Gilles Hunault for advice on GLM analysis and Matthieu Barret for critical review of the manuscript. LDN was supported by the LABEX TULIP (ANR-10-LABX-41).

REFERENCES

1. **Porter SL, Wadhams GH, Armitage JP.** 2011. Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**:153–65.
2. **Hazelbauer GL, Falke JJ, Parkinson JS.** 2008. Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem. Sci.* **33**:9–19.
3. **Vladimirov N, Sourjik V.** 2009. Chemotaxis: how bacteria use memory. *Biol. Chem.* **390**:1097–104.
4. **Henry J, Crosson S.** 2011. Ligand binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**:261–286.
5. **Wadhams GH, Armitage JP.** 2004. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**:1024–37.
6. **Baker MD, Wolanin PM, Stock JB.** 2006. Systems biology of bacterial chemotaxis. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:187–92.
7. **Kentner D, Sourjik V.** 2006. Spatial organization of the bacterial chemotaxis system. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:619–24.
8. **Sourjik V, Wingreen N.** 2012. Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**:262–268.
9. **Yost CK, Clark KT, Bel KL Del, Hynes MF.** 2003. Characterization of the nodulation plasmid encoded chemoreceptor gene *mcpG* from *Rhizobium leguminosarum*. *BMC Microbiol.* **3**:1–10.
10. **Gage DJ.** 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing *Rhizobia* during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:280–300.

- 581 11. **Yao J, Allen C.** 2006. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of
582 the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. J. Bacteriol. **188**:3697–3708.
- 583 12. **McCullen CA, Binns AN.** 2006. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell
584 interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. Annu.
585 Rev. Cell Dev. Biol. **22**:101–27.
- 586 13. **Cooper JE.** 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing
587 complexity in a molecular dialogue. J. Appl. Microbiol. **103**:1355–65.
- 588 14. **Antúnez-Lamas M, Cabrera E, Lopez-Solanilla E, Solano R, González-Melendi P,**
589 **Chico JM, Toth I, Birch P, Pritchard L, Prichard L, Liu H, Rodriguez-Palenzuela**
590 **P.** 2009. Bacterial chemoattraction towards jasmonate plays a role in the entry of
591 *Dickeya dadantii* through wounded tissues. Mol. Microbiol. **74**:662–71.
- 592 15. **Mhedbi-Hajri N, Darrasse A, Pigné S, Durand K, Fouteau S, Barbe V, Manceau**
593 **C, Lemaire C, Jacques M-A.** 2011. Sensing and adhesion are adaptive functions in
594 the plant pathogenic xanthomonads. BMC Evol. Biol. **11**:67.
- 595 16. **Hayward AC.** 1993. The host of *Xanthomonas*. In: *Xanthomonas*; pp. 51-54. J.G.
596 Swings and E.L. Civerolo (eds.); Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- 597 17. **Dye D, Bradbury J, Goto M, Hayward A, Lelliot R, Schroth M.** 1980. International
598 standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar
599 names and pathotypes. Rev. Plant Pathol. **59**:153–168.
- 600 18. **Fargier E, Manceau C.** 2007. Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas*
601 *campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv.
602 *campestris*. Plant Pathol. **56**:805–818.
- 603 19. **Fargier E, Fischer-Le Saux M, Manceau C.** 2011. A multilocus sequence analysis of
604 *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking
605 pathovars of this species. Syst. Appl. Microbiol. **34**:156–65.
- 606 20. **Bogdanove AJ, Koebnik R, Lu H, Furutani A, Angiuoli S V, Patil PB, Van Sluys**
607 **M-A, Ryan RP, Meyer DF, Han S-W, Aparna G, Rajaram M, Delcher AL,**
608 **Phillippy AM, Puiu D, Schatz MC, Shumway M, Sommer DD, Trapnell C,**
609 **Benahmed F, Dimitrov G, Madupu R, Radune D, Sullivan S, Jha G, Ishihara H,**
610 **Lee S-W, Pandey A, Sharma V, Sriariyanun M, Szurek B, Vera-Cruz CM,**
611 **Dorman KS, Ronald PC, Verdier V, Dow JM, Sonti R V, Tsuge S, Brendel V,**
612 **Rabinowicz PD, Leach JE, White FF, Salzberg SL.** 2011. Two new complete
613 genome sequences offer insight into host and tissue specificity of plant pathogenic
614 *Xanthomonas* spp. J. Bacteriol. **193**:5450–5464.
- 615 21. **Hugouvieux V, Barber CE, Daniels MJ.** 1998. Entry of *Xanthomonas campestris* pv.
616 *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early
617 infection events in bacterial pathogenesis. Mol. Plant. Microbe. Interact. **11**:537–43.

- 618 22. **Al-Shehbaz IA, Beilstein MA, Kellogg EA.** 2006. Systematics and phylogeny of the
619 *Brassicaceae* (*Cruciferae*): an overview. *Plant Syst. Evol.* **259**:89–120.
- 620 23. **Bailey CD, Koch MA, Mayer M, Mummenhoff K, O’Kane SL, Warwick SI,**
621 **Windham MD, Al-Shehbaz IA.** 2006. Toward a global phylogeny of the
622 *Brassicaceae*. *Mol. Biol. Evol.* **23**:2142–60.
- 623 24. **Beilstein MA, Shehbaz IA, Kellogg EA.** 2006. *Brassicaceae* phylogeny and trichome
624 evolution. *Am. J. Bot.* **93**:607–619.
- 625 25. **Beilstein M a, Al-Shehbaz IA, Mathews S, Kellogg EA.** 2008. *Brassicaceae*
626 phylogeny inferred from phytochrome A and *ndhF* sequence data: tribes and trichomes
627 revisited. *Am. J. Bot.* **95**:1307–1327.
- 628 26. **Redovniković IR, Glivetić T, Delonga K, Vorkapic-Furac J.** 2008. Glucosinolates
629 and their potential role in plant. *Period. Biol.* **110**:297–309.
- 630 27. **Bohinc T, Ban G, Ban D, Trdan S.** 2012. Glucosinolates in plant protection
631 strategies: A review. *Arch. Biol. Sci.* **64**:821–828.
- 632 28. **Bringmann G, Kajahn I, Neusüss C, Pelzing M, Laug S, Unger M, Holzgrabe U.**
633 2005. Analysis of the glucosinolate pattern of *Arabidopsis thaliana* seeds by capillary
634 zone electrophoresis coupled to electrospray ionization-mass spectrometry.
635 *Electrophoresis* **26**:1513–22.
- 636 29. **Bell L, Wagstaff C.** 2014. Glucosinolates, myrosinase hydrolysis products, and
637 flavonols found in rocket (*Eruca sativa* and *Diplotaxis tenuifolia*). *J. Agric. Food*
638 *Chem.* **62**:4481–92.
- 639 30. **Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P.** 2001. The chemical diversity and distribution
640 of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **56**:5–51.
- 641 31. **Bressan M, Roncato M-A, Bellvert F, Comte G, Haichar FZ, Achouak W, Berge**
642 **O.** 2009. Exogenous glucosinolate produced by *Arabidopsis thaliana* has an impact on
643 microbes in the rhizosphere and plant roots. *ISME J.* **3**:1243–57.
- 644 32. **Elfoul L, Rabot S, Khelifa N, Quinsac A, Duguay A, Rimbault A.** 2001. Formation
645 of allyl isothiocyanate from sinigrin in the digestive tract of rats monoassociated with a
646 human colonic strain of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *FEMS Microbiol. Lett.* **197**:99–
647 103.
- 648 33. **Krul C, Humblot C, Philippe C, Vermeulen M, van Nuenen M, Havenaar R,**
649 **Rabot S.** 2002. Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human
650 colonic microflora in a dynamic *in vitro* large-intestinal model. *Carcinogenesis*
651 **23**:1009–16.
- 652 34. **Merritt SZ.** 1996. Within-plant variation in concentrations of amino acids, sugar, and
653 sinigrin in phloem sap of black mustard, *Brassica nigra* (L.) Koch (*Cruciferae*). *J.*
654 *Chem. Ecol.* **22**:1133–45.

- 655 35. **Da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB,**
656 **Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LMC, do Amaral AM,**
657 **Bertolini MC, Camargo LEA, Camarotte G, Cannavan F, Cardozo J, Chambergo**
658 **F, Ciapina LP, Cicarelli RMB, Coutinho LL, Cursino-Santos JR, El-Dorry H,**
659 **Faria JB, Ferreira AJS, Ferreira RCC, Ferro MIT, Formighieri EF, Franco MC,**
660 **Greggio CC, Gruber A, Katsuyama AM, Kishi LT, Leite RP, Lemos EGM, Lemos**
661 **MVF, Locali EC, Machado MA, Madeira AMBN, Martinez-Rossi NM, Martins**
662 **EC, Meidanis J, Menck CFM, Miyaki CY, Moon DH, Moreira LM, Novo MTM,**
663 **Okura VK, Oliveira MC, Oliveira VR, Pereira HA, Rossi A, Sena JAD, Silva C,**
664 **de Souza RF, Spinola LAF, Takita MA, Tamura RE, Teixeira EC, Tezza RID,**
665 **Trindade dos Santos M, Truffi D, Tsai SM, White FF, Setubal JC, Kitajima JP.**
666 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host
667 specificities. *Nature* **417**:459–63.

- 668 36. **Darsonval A, Darrasse A, Durand K, Bureau C, Cesbron S, Jacques M-A.** 2009.
669 Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seed of
670 *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **22**:747–57.

- 671 37. **Pruvost O, Savelon C, Boyer C, Chiroleu F, Gagnevin L, Jacques M-A.** 2009.
672 Populations of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* from asymptomatic mango
673 leaves are primarily endophytic. *Microb. Ecol.* **58**:170–8.

- 674 38. **Whitfield C, Sutherland IW, Cripps RE.** 1982. Glucose metabolism in *Xanthomonas*
675 *campestris*. *J. Gen. Microbiol.* **128**:981–985.

- 676 39. **Brisset M-N, Dugé de Bernonville T.** 2011. Device for determining or studying the
677 state of stimulation of the natural defenses of plants or portions of plants.
678 WO/2011/161388. WO/2011/161388, WO/2011/161388.

- 679 40. **Rudolph K.** 1993. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: Swings JG, Civerolo EL
680 (eds) *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London.

- 681 41. **Hawes MC, Smith LY.** 1989. Requirement for chemotaxis in pathogenicity of
682 *Agrobacterium tumefaciens* on roots of soil-grown pea plants. *J. Bacteriol.* **171**:5668–
683 71.

- 684 42. **Antúnez-Lamas M, Cabrera-Ordóñez E, López-Solanilla E, Raposo R, Trelles-**
685 **Salazar O, Rodríguez-Moreno A, Rodríguez-Palenzuela P.** 2009. Role of motility
686 and chemotaxis in the pathogenesis of *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia*
687 *chrysanthemi* 3937). *Microbiology* **155**:434–42.

- 688 43. **Windsor AJ, Reichelt M, Figuth A, Svatos A, Kroymann J, Kliebenstein DJ,**
689 **Gershenzon J, Mitchell-Olds T.** 2005. Geographic and evolutionary diversification of
690 glucosinolates among near relatives of *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*).
691 *Phytochemistry* **66**:1321–33.

- 692 44. **Madsen SR, Olsen CE, Nour-Eldin HH, Halkier B a.** 2014. Elucidating the role of
693 transport processes in leaf glucosinolate distribution. *Plant Physiol.* **166**:246114–
694 246249.

- 695 45. **Webb BA, Hildreth S, Helm RF, Scharf BE.** 2014. *Sinorhizobium meliloti*
696 chemoreceptor McpU mediates chemotaxis toward host plant exudates through direct
697 proline sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**:3404–15.
- 698 46. **Ikawa Y, Furutani A, Ochiai H, Tsuge S.** 2014. StoS, a hybrid histidine kinase
699 sensor of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, is activated by sensing low O₂
700 concentration and is involved in stress tolerance and virulence. *Mol. plant microbe*
701 *Interact.* **27**:537–545.
- 702 47. **Nishiyama S, Suzuki D, Itoh Y, Suzuki K, Tajima H, Hyakutake A, Homma M,**
703 **Butler-Wu SM, Camilli A, Kawagishi I.** 2012. Mlp24 (McpX) of *Vibrio cholerae*
704 implicated in pathogenicity functions as a chemoreceptor for multiple amino acids.
705 *Infect. Immun.* **80**:3170–8.
- 706 48. **Ratnerman EL, Welch RA.** 2013. Chemoreceptors of *Escherichia coli* CFT073 play
707 redundant roles in chemotaxis toward urine. *PLoS One* **8**:e54133.
- 708 49. **Rahman H, King RM, Shewell LK, Semchenko EA, Hartley-Tassell LE, Wilson**
709 **JC, Day CJ, Korolik V.** 2014. Characterisation of a multi-ligand binding
710 chemoreceptor CcmL (Tlp3) of *Campylobacter jejuni*. *PLoS Pathog.* **10**:e1003822.
- 711 50. **Butler SM, Camilli A.** 2004. Both chemotaxis and net motility greatly influence the
712 infectivity of *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:5018–23.
- 713 51. **Alphen LB van, Bleumink-Pluym NMC, Rochat KD, van Balkom BWM, Wösten**
714 **MMSM, van Putten JPM.** 2008. Active migration into the subcellular space precedes
715 *Campylobacter jejuni* invasion of epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **10**:53–66.
- 716 52. **Yao J, Allen C.** 2007. The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for
717 normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *J. Bacteriol.* **189**:6415–
718 24.
- 719 53. **Alexandre G.** 2010. Coupling metabolism and chemotaxis-dependent behaviours by
720 energy taxis receptors. *Microbiology* **156**:2283–93.
- 721 54. **Mao D, Tao J, Li C, Luo C, Zheng L, He C.** 2012. Light signaling mediated by PAS
722 domain-containing proteins in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *FEMS*
723 *Microbiol. Lett.* **326**:31–9.
- 724 55. **Schweinitzer T, Josenhans C.** 2010. Bacterial energy taxis: a global strategy? *Arch.*
725 *Microbiol.* **192**:507–20.
- 726 56. **Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U.** 2001. cDNA-AFLP analysis unravels a
727 genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv.
728 *vesicatoria*. *Mol. Microbiol.* **41**:1271–81.
- 729 57. **Seo Y-S, Sriariyanun M, Wang L, Pfeiff J, Phetsom J, Lin Y, Jung K-H, Chou**
730 **HH, Bogdanove A, Ronald P.** 2008. A two-genome microarray for the rice pathogens

- 731 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola* and its use in the
732 discovery of a difference in their regulation of *hrp* genes. BMC Microbiol. **8**:99.
- 733 58. **Guy E, Genissel A, Hajri A, Chabannes M, David P, Carrere S, Lautier M, Roux**
734 **B, Boureau T, Arlat M, Poussier S, Noël LD.** 2013. Natural genetic variation of
735 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathogenicity on *Arabidopsis* revealed by
736 association and reverse genetics. MBio **4**:e00538–12.
- 737 59. **Engler C, Kandzia R, Marillonnet S.** 2008. A one pot, one step, precision cloning
738 method with high throughput capability. PLoS One **3**:e3647.
- 739 60. **Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J.
740 Mol. Biol. **166**:557–580.
- 741 61. **Finan TM, Kunkel B, De Vos GF, Signer ER.** 1986. Second symbiotic megaplasmid
742 in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. J.
743 Bacteriol. **167**:66–72.
- 744 62. **Devoret R, Blanco M.** 1970. Mutants of *Escherichia coli* K12 (lambda)+ non-
745 inducible by thymine deprivation. Molc. Gen. Genet. **107**:272–280.
- 746 63. **Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.** 1994. Small
747 mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids
748 pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium*
749 *glutamicum*. Gene **145**:69–73.
- 750 64. **Staskawicz B, Dahlbeck D, Keen N, Napoli C.** 1987. Molecular characterization of
751 cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*.
752 J. Bacteriol. **169**:5789–94.
- 753 65. **Oshiro EE, Nepomuceno RSL, Faria JB, Ferreira LCS, Ferreira RCC.** 2006. Site-
754 directed gene replacement of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. J.
755 Microbiol. Methods **65**:171–9.
- 756 66. **Solaiman DKY.** 1998. Genetic transformation of *Pseudomonas oleovorans* by
757 electroporation. Biotechnol. Tech. **12**:829–832.
- 758 67. **Michael T.** 1994. The Bean plant.R. Hall. APS Press, Compendium of bean diseases.
759 St Paul.
- 760 68. **Mourgues F, Brisset M-N, Chevreau E.** 1998. Activity of different antibacterial
761 peptides on *Erwinia amylovora* growth , and evaluation of the phytotoxicity and
762 stability of cecropins. Plant Sci. **139**:83–91.
- 763 69. **Mazumder R, Phelps TJ, Krieg NR, Benoit RE.** 1999. Determining chemotactic
764 responses by two subsurface microaerophiles using a simplified capillary assay
765 method. J. Microbiol. Methods **37**:255–263.

- 766 70. **Arlat M, Gough CL, Barber CE, Boucher C, Daniels MJ.** 1991. *Xanthomonas*
767 *campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of
768 *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. plant-microbe Interact.* **4**:593–601.
- 769 71. **Darrasse A, Darsonval A, Boureau T, Brisset M-N, Durand K, Jacques M-A.**
770 2010. Transmission of plant-pathogenic bacteria by nonhost seeds without induction of
771 an associated defense reaction at emergence. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:6787–96.
- 772 72. **Venisse J-S, Malnoy M, Faize M, Paulin J-P, Brisset M-N.** 2002. Modulation of
773 defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with
774 *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **15**:1204–12.
- 775 73. **Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-
776 time quantitative PCR and the 2(-DDCt) method. *Methods* **25**:402–8.
- 777 74. **Sokal R, Rohlf F.** 1969. *Biometry: The principles and practice of statistics in*
778 *biological research.* W. H. Freeman & Co., San Francisco.
- 779 75. **Dixon P.** 2008. Models of accuracy in repeated-measures designs. *J. Mem. Lang.*
780 **59**:447–456.
- 781 76. **Akaike H.** 1973. Information theory and an extension of maximum likelihood
782 principle. Petrov, BN. 2nd international symposium on information theory, Budapest,
783 Akademiai Kiado.
- 784

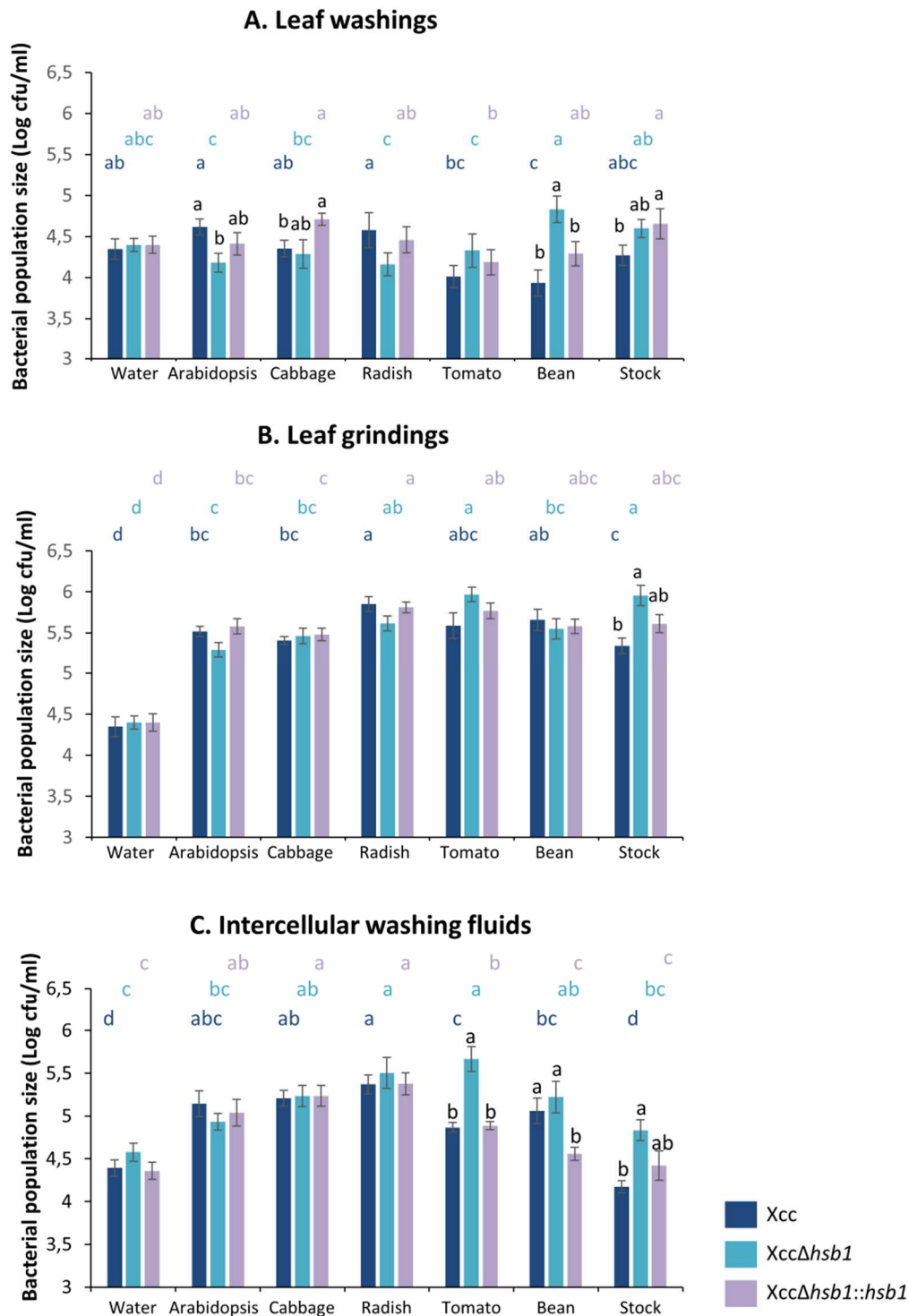


Fig. S1. Chemotactic responses of *Xcc*, *XccΔhsb1*, and *XccΔhsb1::hsb1* to plant extracts. A capillary assay was used to test the effect of leaf washings, leaf grindings, and intercellular washing fluids. Bacteria, which were retrieved in the capillary disposal were quantified by dilution plating. The values indicate the size of the bacterial populations (Log cfu/ml). Different black letters indicate significant differences between strains for a given plant extract based on the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). Different dark blue, turquoise, and purple letters indicate significant differences between plant extract for *Xcc*, *XccΔhsb1*, and *XccΔhsb1::hsb1*, respectively.

A

Best model selection				
GLM model	Number of parameters (k)	Log-likelihood	Delta AIC	Akaike weight
<u>Strain + experiment</u>	10	-15.98	51.97	0.99
Strain	7	-23.29	60.58	0.01
Strain + experiment + strain * experiment	22	-11.14	66.27	0.00
Experiment	4	-41.34	90.68	0.00
(Null)	1	-47.80	97.61	0.00

B

Post hoc analysis		
model	Number of parameters (k)	Log-likelihood
Hypothesis 1 + experiment	7	-16.03
Hypothesis 2 + experiment	6	-16.05
Hypothesis 3 + experiment	5	-37.58
<u>Hypothesis 4 + experiment</u>	5	-16.05
		42.09

Fig. S2. In the general linear model (GLM) for the infection leaf rate analysis, the experiment was considered as a disturbance parameter and the strain is the predictor. Five models were tested (E) and based on the Akaike Information Criterion (AIC) comparison, the best GLM model was Strain + experiment. In the post-hoc analysis, (F) hypothesis 1 displays strains in 4 classes (1: Water; 2: *Xcc* ATCC 33913; 3: *Xcc*Δ*hsbI*::*hsbI*, *Xcc*Δ*cheY* pLAFR3*cheY*; 4: *Xcc*Δ*hsbI*, *Xcc*Δ*cheY*, *Xcc*Δ*fliC*), hypothesis 2 displays strains in 3 classes (1: Water; 2: *Xcc* ATCC 33913, *Xcc*Δ*hsbI*::*hsbI*, *Xcc*Δ*cheY* pLAFR3*cheY*; 3: *Xcc*Δ*hsbI*, *Xcc*Δ*cheY*, *Xcc*Δ*fliC*), hypothesis 3 displays strains in 2 classes (1: Water; 2: *Xcc* ATCC 33913, *Xcc*Δ*hsbI*::*hsbI*, *Xcc*Δ*cheY* pLAFR3*cheY*, *Xcc*Δ*hsbI*, *Xcc*Δ*cheY*, *Xcc*Δ*fliC*), and hypothesis 4 also displays strains in 2 classes (1: Water, *Xcc*Δ*hsbI*, *Xcc*Δ*cheY*, *Xcc*Δ*fliC*; 2: *Xcc* ATCC 33913, *Xcc*Δ*hsbI*::*hsbI*, *Xcc*Δ*cheY* pLAFR3*cheY*).

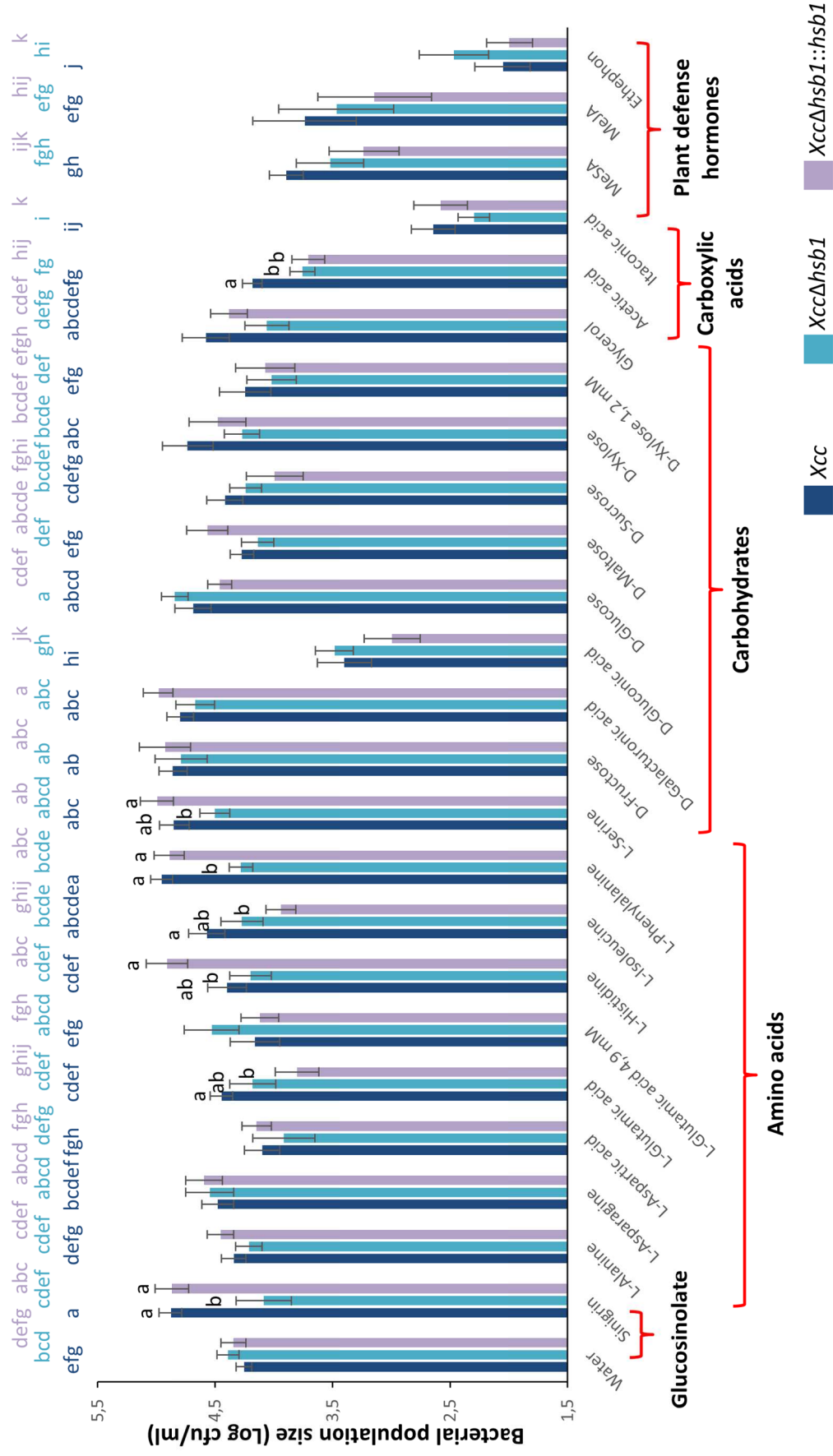


Fig. S3. Chemotactic responses of *Xcc*, *XccΔhsb1*, and *XccΔhsb1::hsb1* to various molecules in capillary assay. Bacteria, which were retrieved in the capillary disposal were quantified by dilution plating. The values indicate the size of the bacterial populations (Log_{10} cfu/ml). Different black letters indicate significant differences between strains for a given molecule based on the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). Different dark blue, turquoise, and purple letters indicate significant differences between plant extract for *Xcc*, *XccΔhsb1*, and *XccΔhsb1::hsb1*, respectively.

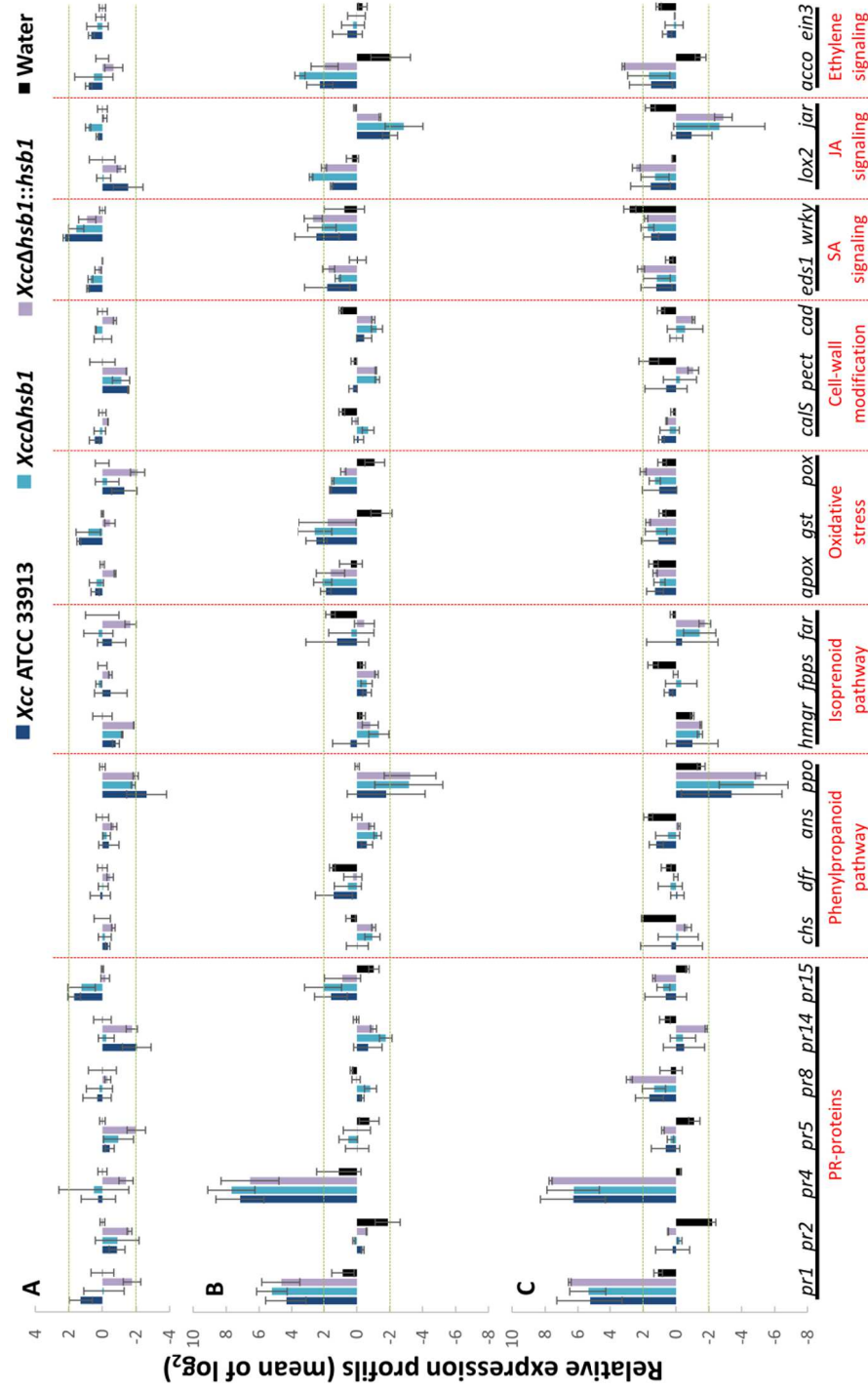


Fig. S4. Relative normalized expression of 26 defense genes in tomato leaves after bacterial strain infiltration. Tomato leaves were vacuum-infiltrated with 1×10^7 cfu/ml suspensions of *Xcc* ATCC 33913, *XccΔhsb1*, *XccΔhsb1::hsb1*, and water as negative control. Samples were taken 2 (A), 8 (B) and 24 h (C) post inoculation. qRT-PCRs were performed in 96-wells plates containing dehydrated primers of triplicate sets of 26 defense genes, three reference genes and one negative control. Expression values were calculated with the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. Dotted bars represent a 4-times induction or repression relative to the negative control. The mean of water treatment values sampled 2 h post inoculation was used for calibration at each sampling date, and the geometric mean of values obtained for internal controls (*gapdh*, *actin2*, and *tua*) was used to normalize each sample. Means and SEM were calculated for data from two independent experiments, each containing two replicates per sample.

Table S1. Primers used in this study.

Target gene	Use	Primer name	Primer sequence	Annealing temperature (°C)	Size of the PCR fragment (bp)
<i>XCC1941</i>	Mutagenesis with pΔ13	AI096DfliC.1F	<u>tttggtctcaaggt</u> CGATCGACAAACGCCAATTC	58	534 (<i>Xcc</i>)
		AI097DfliC.2R	tttggtctcacataTTTGATATCTCCTCTAAGCG		
		AI098DfliC.2F	tttggtctcatatgTCGGCAGCGTCACAGCAACG	63	443 (<i>Xcc</i>)
		AI099DfliC.3R	<u>tttggtctcacttg</u> GACCACTTGTCCAGCGCAG		
		AI100DfliC.F	TCAACACCAACAGTTCGAGC	62	537 (<i>Xcc</i>) / 0 (<i>Xcc</i> Δ <i>fliC</i>)
		AI101DfliC.R	TACCGCTGAGCGAACCCGAC		
<i>XCC1905</i>	Mutagenesis with pΔ13	AI096DfliC.1F	<u>tttggtctcaaggt</u> CGATCGACAAACGCCAATTC	62	2149 (<i>Xcc</i>) / 921 (<i>Xcc</i> Δ <i>fliC</i>)
		AI099DfliC.3R	<u>tttggtctcacttg</u> GACCACTTGTCCAGCGCAG		
		AI027DcheY.1F	<u>tttggtctcaaggt</u> CCACCATCGCGCAGCTGGTT	62	371 (<i>Xcc</i>)
		AI028DcheY.2R	tttggtctcacataTGAAACGCCACCGTGGACAC		
		AI029DcheY.2F	tttggtctcatatgGTTCTTATTACATCAAGCTC	62	544 (<i>Xcc</i>)
		AI030DcheY.3R	<u>tttggtctcacttg</u> GGTGCCGCGCTCGGTGCACC		
<i>Hsb1</i>	Mutagenesis with pΔ13	AI047DcheY.F	CAGACGTTTCGAACACCTTGC	60	349 (<i>Xcc</i>) / 0 (<i>Xcc</i> Δ <i>cheY</i>)
		AI048DcheY.R	GGACGACTTCTCGACGATGC		
		AI094DcheY.F'	GATCCAGCGTGCGATGGCTG	63	1268 (<i>Xcc</i>) / 915 (<i>Xcc</i> Δ <i>cheY</i>)
		AI095DcheY.R'	GATGCCGCTGCCCGACTACC		
		AI032Dmcp0324.1F	<u>tttggtctcaaggt</u> GATGTGCCGGCCCTGCATGG	63	537 (<i>Xcc</i>)
		AI033Dmcp0324.2R	tttggtctcacataTTCCACCAGCCCGTGTGCC		
<i>Hsb1</i>	Mutagenesis and complementation with pΔ13	AI034Dmcp0324.2F	<u>tttggtctcatatg</u> GCAACGCTGTGGTGTCTATC	60	497 (<i>Xcc</i>)
		AI035Dmcp0324.3R	<u>tttggtctcacttg</u> GCTAGAAACACGCGTTCCAC		
		AI049Dmcp0324.F	CGATTGCCGTGCACCACTC	65	882 (<i>Xcc</i>) / 0 (<i>Xcc</i> Δ <i>hsb1</i>)
		AI130Dmcp0324.R	CGTGACACGGCGTGACGCTC		
		AI032Dmcp0324.1F	<u>tttggtctcaaggt</u> GATGTGCCGGCCCTGCATGG	62	2815 (<i>Xcc</i>) / 1034 (<i>Xcc</i> Δ <i>hsb1</i>)
		AI035Dmcp0324.3R	<u>tttggtctcacttg</u> GCTAGAAACACGCGTTCCAC		
<i>XCC1905</i>	Complementation of <i>Xcc</i> Δ <i>cheY</i> with pLAFR3	AI121CcheY.R	TAGgaattcGATGTGAATAAGAAACATGCGG	59	429 (<i>Xcc</i>)
		AI116CcheY.F	CATaagcttCCACGGTGGCGTTTCATCAGGC		

Regions of <i>hsbI</i>	For <i>XccΔhsbI::hsbI</i> sequencing	AI188mcp0324.F	ACCGCACCAATGCTGGTCG	63	994 (<i>Xcc</i>)
		AI189mcp0324.R	GCCTGCGCCAGCGAACCGG		
		AI190mcp0324.F	GCAGGCGGTGGTCTGCCGG	66	974 (<i>Xcc</i>)
		AI191mcp0324.R	CCTGCTGCTCCAGTGCCTCG		
		AI192mcp0324.F	CGACCTGTGCAACGCATCG	62	837 (<i>Xcc</i>)
		AI193mcp0324.R	AGGCTCACTGCATCTTCCAGC		
		AI194mcp0324.F	GCACGCTGAGCACGATTGCCG	66	849 (<i>Xcc</i>)
		AI195mcp0324.R	GCGGCAATACGCAAGGGCAC		
pΔ13	Sequencing primers	M13F RevSac	GTAAACGACGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGAC	52	variable

3. Résultats complémentaires

3.1. Introduction

Nos résultats suggèrent que Hsb1 serait impliqué dans l'expansion de la gamme d'hôte de *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) et de *X. campestris* pv. *raphani* (*Xcr*) par rapport à *X. campestris* pv. *incanae* (*Xci*). *Xci* n'est pathogène que sur *Matthiola incana* (giroflée) tandis que *Xcc* et *Xcr* sont pathogènes sur une large gamme de *Brassicaceae* sauf la giroflée (Fargier et Manceau, 2007). De manière plus précise, Hsb1 est impliqué dans l'internalisation de *Xcc* dans les tissus foliaires. En effet, un mutant *hsb1* de *Xcc* ATCC 33913 est altéré dans sa capacité à s'internaliser dans les tissus de l'arabette, plante hôte de *Xcc*, par rapport à la souche parentale. Ce même mutant s'internalise plus efficacement dans les tissus des plantes non-hôtes (giroflée, tomate et haricot). Etant impliqué dans l'internalisation de *Xcc* dans les tissus des plantes hôtes, ce gène devrait être exprimé très précocement lors de l'interaction avec la plante et sans doute à la surface des feuilles. Ce gène est-il exprimé constitutivement ? Comme de nombreux gènes codant des protéines impliquées dans l'adhésion et autres phases précoces de l'interaction, *hsb1* est-il régulé par le master régulateur HrpG ? Afin de répondre à ces questions, nous rapportons les résultats d'une analyse transcriptomique par RNAseq conduite par Brice Roux et Laurent Noël du LIPM de Toulouse, dans le cadre du projet collaboratif ANR Xanthomix (2010-2014). Cette étude a été conduite sur *Xcc* 8004 et *Xcc*8004::*hrpG**. Il est connu que HrpG active l'expression de *hrpX* (Wengelnik *et al.*, 1996) et des gènes impliqués dans la dégradation de la paroi cellulaire, l'attachement, la production de phytohormones et des récepteurs TonB-dépendants (TBDR) (Valls *et al.*, 2006; Blanvillain *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2011). HrpX active l'expression des gènes *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) et *hrc* (*hrp* conserved) (Wengelnik *et al.*, 1996; Koebnik *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009). L'induction *in vitro* du gène codant HrpG chez *Xcc*8004::*hrpG** a pour objectif de mimer ce qu'il se passe *in planta*, c'est à dire l'induction des gènes régulés par HrpG (Büttner et Bonas, 2010).

Tableau 3.I : Locus tag des orthologues des gènes codant les MCP chez *Xcc* 8004 et *Xcc* ATCC 33913. Les gènes répertoriés ici sont ceux détectés par l'analyse OrthoMCL (chapitre 2). Ce sont donc ceux contenant au moins le domaine Methyl-Accepting (MA).

Gènes codant les MCP	
<i>Xcc</i> 8004	<i>Xcc</i> ATCC 33913
<i>XC_0286</i>	<i>XCC0276</i>
<i>XC_0336</i>	<i>XCC0324</i>
<i>XC_0638</i>	<i>XCC3522</i>
<i>XC_0843</i>	<i>XCC3321</i>
<i>XC_1074</i>	<i>XCC3084</i>
<i>XC_1413</i>	<i>XCC2701</i>
<i>XC_1801</i>	<i>XCC2315</i>
<i>XC_2136</i>	<i>XCC2047</i>
<i>XC_2223</i>	<i>XCC1962</i>
<i>XC_2304</i>	<i>XCC1884</i>
<i>XC_2307</i>	<i>XCC1881</i>
<i>XC_2308</i>	<i>XCC1880</i>
<i>XC_2309</i>	<i>XCC1879</i>
<i>XC_2311</i>	<i>XCC1878</i>
<i>XC_2313</i>	<i>XCC1876</i>
<i>XC_2314</i>	<i>XCC1875</i>
<i>XC_2316</i>	<i>XCC1873</i>
<i>XC_2320</i>	<i>XCC1869</i>
<i>XC_2504</i>	<i>XCC1727</i>

3.2. Matériels et méthodes

A côté de la souche sauvage *Xcc* 8004, une souche, *Xcc*8004::*hrpG*^{*}, surexprimant le master régulateur HrpG phosphorylé, a été construite par insertion chromosomique de *hrpG*^{*} (L. Noël, comm. pers.). Les souches ont été cultivées à 28°C avec agitation (150 rpm) pendant une nuit dans du milieu MOKA (extrait de levure 4 g/L ; casamino acides 8 g/L ; KH₂PO₄ 2 g/L ; MgSO₄.7H₂O 0,3 g/L) liquide jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ de 0,1 à 0,4. Pour chacune des trois cultures indépendantes de chaque souche, 10 ml de culture ont été filtrés pour récupérer les cellules bactériennes (pores de 0,22 µm, Millipore, Molsheim, France). Le kit mirVanaTM miRNA isolation (Ambion Fisher Scientific Europe, Illkirch, France) a permis de lyser les cellules et d'extraire les ARN totaux. La qualité et la quantité des ARN ont été vérifiées sur gel d'agarose et l'absorbance a été mesurée au Nanodrop. Les ARN ont été nettoyés et concentrés en utilisant le kit SurePrepRNA clean-up (Fisher). Les ARN ribosomaux ont été éliminés par oligocapture avec le kit Ribominus (Fisher). Afin d'éliminer la contamination par l'ADN, les échantillons ont été traités par la turbo-DNase I (Ambion). La quantité et la qualité des ARN ont été vérifiées en utilisant Agilent Bioanalyser (Agilent Technologies). Les petits et longs ARN ont été séparés en utilisant le kit Zymo-Spin (Proteogen, Saint Marcel, France). Fasteris (Geneva, Switzerland) a généré les ADNc, les bibliothèques d'ADNc et les séquences en utilisant la technologie Illumina. Les comptages (« reads » ou « counts ») de chaque échantillon ont été alignés sur la séquence génomique de *Xcc* 8004. Sous R (<http://www.r-project.org/>), une analyse DESeq (Anders et Huber, 2010) a permis de mettre en évidence les différentiels d'expressions des données de comptages. Les valeurs de comptages transformés en log₂ sont utilisées pour calculer les moyennes d'expression par gène et par souche.

3.3. Résultats

L'orthologue de *hsb1* chez *Xcc* 8004 est induit par HrpG.

Chez *Xcc* 8004 comme chez *Xcc* ATCC 33913, 19 gènes codant des MCP ont été détectés par l'analyse OrthoMCL (chapitre 2, tableau 3.I). Pour *Xcc* 8004 cultivée en milieu riche, tous les gènes codant les MCP sont exprimés avec un niveau de transcription compris entre 5 et 12 (moyenne des comptages en log₂) avec une valeur de 7,02 pour l'orthologue de *hsb1* chez *Xcc* 8004 (*XC_0336*) (figure 3.1). Ainsi, les 19 gènes codant les MCP sont

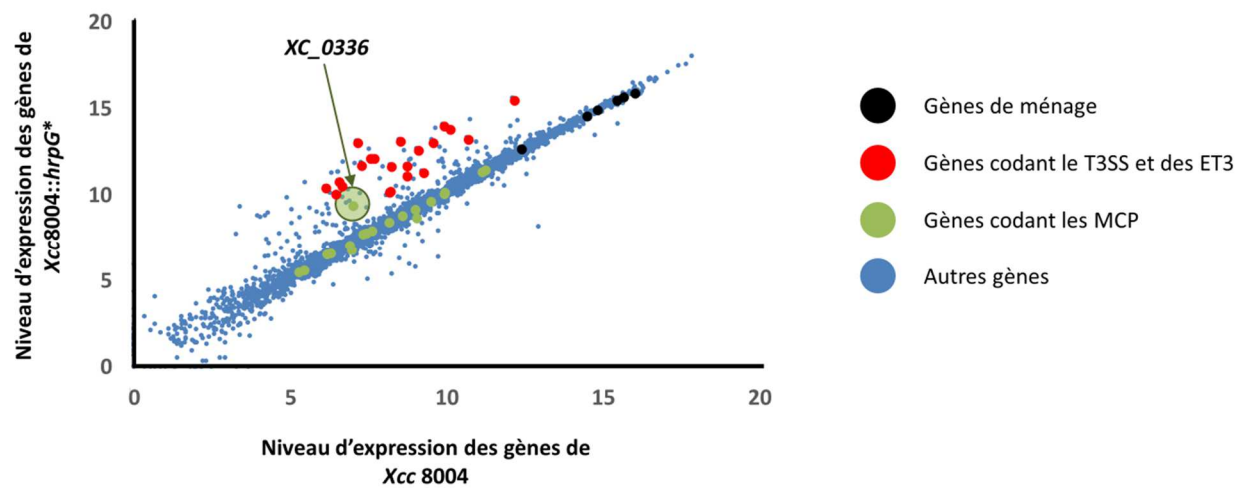


Figure 3.1 : Niveaux de transcription des gènes de *Xcc* 8004. Les niveaux de transcription de tous les gènes du génome de *Xcc* 8004 et de *Xcc8004::hrpG** (bleu), des gènes de ménages (noir), des gènes codant des effecteurs de type III (ET3) et la structure du système de sécrétion de type III (T3SS) (rouge), et ceux codant les MCP (vert) ont été déterminés grâce à une analyse RNAseq de *Xcc* 8004 et de *Xcc8004::hrpG**.

constitutivement exprimés. Parmi les gènes codant le système flagellaire, le chimiotactisme (données non montrées) et les MCP, *XC_0336* est le seul à être significativement induit par le master régulateur HrpG ($\text{Log}_2 \text{ FoldChange } Xcc8004::hrpG^*/Xcc\ 8004 = 2,19$; $p < 0,001$). Comme attendu, la transcription des gènes de ménage (*XC_3678 atpD*, *XC_2763 dnaK*, *XC_1843 efP*, *XC_0194 glnA*, *XC_0004 gyrB*, *XC_3806 rpoD*) n'est pas significativement induite par HrpG alors que la transcription, par exemple, de *avrBs2* (*XC_0052*), *xopN* (*XC_0241*), *hrcC* (*XC_3003*) ou *hrcU* (*XC_3012*) est significativement induite chez *Xcc8004::hrpG** par rapport à la souche sauvage (figure 3.1).

3.4. Discussion

Nous avons montré que les 19 gènes codant les MCP (détecté par OrthoMCL, donc contenant au moins un domaine MA) sont constitutivement exprimés. Chez *Xcc 8004*, cette expression constitutive est probablement due au fait que les bactéries doivent coloniser la phyllosphère. La surface de la feuille constitue effectivement un environnement très instable (température, rayonnements UV, faible disponibilité en eau et nutriments, jour, nuit) (Turner *et al.*, 2013). Elles doivent donc faire face à ces multiples conditions environnementales et doivent aussi être capables de détecter et de se diriger vers des signaux attractifs émanant des sites d'entrées afin de coloniser les parenchymes et les vaisseaux du xylème. Les données montrent que l'orthologue de *hsb1* chez *Xcc 8004* est significativement surexprimé dans la souche *Xcc8004::hrpG**. En plus des autres facteurs de virulence dont l'induction par HrpG est attendue (SST3, ET3,...) (Guo *et al.*, 2011), HrpG induit aussi l'expression d'un gène codant un MCP. L'objectif en construisant *Xcc8004::hrpG** était bien de mimer ce qu'il se passe *in planta*. Il est alors possible que ce MCP, Hsb1, soit aussi induit dans le cas de l'interaction de *Xcc* avec des plantes hôtes et/ou non-hôtes. Cette hypothèse reste à vérifier *in planta*. Les résultats de transcriptomique ayant été obtenus sur *Xcc 8004*, il faudrait aussi confirmer ces résultats sur *Xcc* ATCC 33913 et un mutant sur-exprimant *hrpG**, afin de pouvoir en partie, généraliser les résultats reportés dans les chapitres 2 et 3. Le mutant *hsb1* ayant un phénotype clair *in planta*, le fait que *hsb1* soit probablement induit *in planta* par HrpG viendrait confirmer le rôle que joue Hsb1 *in planta* dans la détection de signal(aux) favorisant l'internalisation de *Xcc* dans les plantes hôtes et limitant son internalisation dans les tissus de plantes non-hôtes.

Chapitre 4 :
Mobilité des Xanthomonas
et genèse d'une souche non
flagellée

1. Introduction

Dans l'équipe EmerSys la souche modèle utilisée pour de nombreuses études de transmission à la semence (Jacques *et al.*, 2005; Darrasse *et al.*, 2010) et d'adaptation à la phyllosphère par génétique fonctionnelle (Darsonval *et al.*, 2008, 2009) est *Xff* 4834-R. Cette souche est très agressive sur haricot (Vidaver, 1993). L'annotation de la séquence génomique de cette souche par les membres du French Network on Xanthomonads (<https://www.reseau-xantho.org>), a révélé qu'elle comportait une délétion importante dans l'ilot génomique dédié au système flagellaire rendant cette souche non mobile par nage. Ce résultat était surprenant car la mobilité par un unique flagelle polaire est une caractéristique générale du genre *Xanthomonas* (Bradbury, 1984). Le système flagellaire participe aux capacités de survie des bactéries *via* la formation de biofilm (Barken *et al.*, 2008; Malamud *et al.*, 2011), à la sécrétion de facteur de virulence (Konkel *et al.*, 2004) et à l'agressivité (Iyoda *et al.*, 2001), mais il est également un éliciteur des réactions de défense de l'hôte (Chinchilla *et al.*, 2006). Comprendre la genèse de la perte de cet appendice bactérien et sa fréquence dans les populations de *Xanthomonas* a été notre objectif. Pour ce faire, j'ai participé à l'étude de la distribution des gènes codant le système flagellaire dans une collection de plus de 300 souches représentant la diversité des *Xanthomonas*. Cette étude compose une partie de l'article publié dans BMC Genomics (Darrasse *et al.*, 2013) dont je suis co-auteur. Par ailleurs, cette souche non flagellée ayant été isolée en même temps que des souches flagellées, nous avons fait séquencer le génome d'une de ces souches flagellées (*Xff* CFBP 4884) et avons procédé à une analyse comparative de leur génome. Le génome de la souche CFBP 4884 a été publié dans la revue Genome Announcements (Indiana *et al.*, 2014), et l'analyse comparative des génomes est présentée dans une partie de données complémentaires à la fin de ce chapitre.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads

Armelle Darrasse^{1,2,3}, Sébastien Carrère^{4,5}, Valérie Barbe⁶, Tristan Boureau^{1,2,3}, Mario L. Arrieta-Ortiz^{7,14}, Sophie Bonneau^{1,2,3}, Martial Briand^{1,2,3}, Chrystelle Brin^{1,2,3}, Stéphane Cociancich⁸, Karine Durand^{1,2,3}, Stéphanie Fouteau⁶, Lionel Gagnevin^{9,10}, Fabien Guérin^{9,10}, Endrick Guy^{4,5}, Arnaud Indiana^{1,2,3}, Ralf Koebnik¹¹, Emmanuelle Lauber^{4,5}, Alejandra Munoz⁷, Laurent D Noël^{4,5}, Isabelle Pieretti⁸, Stéphane Poussier^{1,2,3,10}, Olivier Pruvost^{9,10}, Isabelle Robène-Soustrade^{9,10}, Philippe Rott⁸, Monique Royer⁸, Laurana Serres-Giardi^{1,2,3}, Boris Szurek¹¹, Marie-Anne van Sluys¹², Valérie Verdier¹¹, Christian Vernière^{9,10}, Matthieu Arlat^{4,5,13}, Charles Manceau^{1,2,3,15} and Marie-Agnès Jacques^{1,2,3*}

Abstract

Background: Xanthomonads are plant-associated bacteria responsible for diseases on economically important crops. *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (*Xff*) is one of the causal agents of common bacterial blight of bean. In this study, the complete genome sequence of strain *Xff* 4834-R was determined and compared to other *Xanthomonas* genome sequences.

Results: Comparative genomics analyses revealed core characteristics shared between *Xff* 4834-R and other xanthomonads including chemotaxis elements, two-component systems, TonB-dependent transporters, secretion systems (from T1SS to T6SS) and multiple effectors. For instance a repertoire of 29 Type 3 Effectors (T3Es) with two Transcription Activator-Like Effectors was predicted. Mobile elements were associated with major modifications in the genome structure and gene content in comparison to other *Xanthomonas* genomes. Notably, a deletion of 33 kbp affects flagellum biosynthesis in *Xff* 4834-R. The presence of a complete flagellar cluster was assessed in a collection of more than 300 strains representing different species and pathovars of *Xanthomonas*. Five percent of the tested strains presented a deletion in the flagellar cluster and were non-motile. Moreover, half of the *Xff* strains isolated from the same epidemic than 4834-R was non-motile and this ratio was conserved in the strains colonizing the next bean seed generations.

Conclusions: This work describes the first genome of a *Xanthomonas* strain pathogenic on bean and reports the existence of non-motile xanthomonads belonging to different species and pathovars. Isolation of such *Xff* variants from a natural epidemic may suggest that flagellar motility is not a key function for *in planta* fitness.

Keywords: Seed-borne pathogen, Secretion system, Insertion sequence, Bean, Effector, Chemotaxis, Pseudogene

* Correspondence: Marie-Agnes.Jacques@angers.inra.fr

¹INRA, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49071, Beaucouzé, France

²AGROCAMPUS OUEST, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49045, Angers, France

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Xanthomonads are plant-associated bacteria that establish neutral, commensal or pathogenic relationships with plants. Bacteria belonging to the genus *Xanthomonas* are known to be exclusively plant-associated organisms and do not colonize durably other niches. Globally, xanthomonads infect a wide range of economically important crops such as rice, banana, citrus, bean, tomato, pepper, sugarcane, and wheat. More than 124 monocotyledonous and 268 dicotyledonous plant species are hosts of xanthomonads [1,2]. The large host range of the genus strikingly contrasts with the typically narrow host range of individual strains that is restricted to one or several species of a botanical family [3]. Indeed, besides their very homogeneous phenotype, xanthomonads differ mainly by their host specificity. This is illustrated in the pathovar infrasub-specific division, which clusters bacterial strains causing similar symptoms on a same host range [4].

The common blight of bean (CBB), caused by *X. axonopodis* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* (*Xff*), is the most devastating bacterial disease of bean and one of the five major diseases of bean [5]. It causes significant yield loss that can exceed 40% (http://www.eppo.int/QUARANTINE/bacteria/Xanthomonas_phaseoli/XANTPH_ds.pdf). Seed quality losses impact not only bean production but also seed industry worldwide. Its wide geographical distribution is presumed to be due to an efficient seed transmission. CBB affects seed and pod production and marketability of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) but also lima bean (*P. lunatus* L.), tepary (*P. acutifolius* A. Gray), scarlet runner bean (*P. coccineus* L.), and several species belonging to *Vigna* [6]. Bean is a major crop all around the world; in the Americas and in Africa, bean is a staple crop and constitutes one of the main sources of protein for human (up to 60%) and animal feeding [7]. Bean was domesticated independently in Mesoamerica and in the southern Andes more than 3,000 years ago [8,9]. Low to moderate levels of CBB resistance have been identified in a few common bean genotypes from the Mesamerican gene pool, whereas no resistance has been identified in the large-seeded Andean gene pool [10]. The tepary bean possesses the highest level of resistance, whereas only low levels of resistance have been found in common and scarlet runner beans [10]. These resistances have been introgressed into common bean breeding lines but with little success into common bean cultivars of any market class [11]. To date, at least 24 different CBB resistance QTLs have been reported across all eleven linkage groups of common bean [11].

X. axonopodis pv. *phaseoli* and *Xff* colonizes both vascular tissues and parenchyma of their host. CBB agents survive epiphytically until favorable conditions for infection are reached [12]. These bacteria are well adapted to survive harsh phyllosphere conditions following epiphytic

aggregation in biofilms [13]. Penetration through stomata is thought to lead to bacterial colonization of the mesophyll, causing leaf spots. Bacteria progression inside the host leads to the colonization of vascular tissues, but the wilting of the plant is observed only in severe cases of infection [6]. Main CBB symptoms are spots and necrosis, which appear on leaves, stems, pods and seeds. They are especially severe in tropical wet regions [6]. Bacterial ooze may be encountered especially on stems and pods, providing inoculum for secondary spread. In seeds, spots can be distributed all over the seed coat or restricted to the hilum area. Most notably, contamination occurs on plants and seeds that are symptomless, raising concerns about pathogen transmission [13,14].

Many important pathogenicity factors have been described for xanthomonads. To establish themselves successfully in host plants, xanthomonads first adhere to the plant surface, invade the intercellular space of the host tissue, acquire nutrients and counteract plant defense responses. The secretion of effectors into the extracellular milieu or directly into the host cell cytosol leads to successful host infection. The virulence factors allowing xanthomonads to complete these steps include adhesins, EPS, LPS, degradative enzymes and type three effectors (T3Es) [15]. CBB agents are known to secrete several fimbrial and non-fimbrial adhesins, some of which are involved in aggressiveness [16]. The mucoid appearance of *Xap* and *Xff* bacterial colonies is an indication of xanthan production, which is under the regulation of the diffusible factor DSF (our unpublished data). The role of the hrp-Type Three secretion System (T3SS) in infection and bacterial transmission to seed has been previously demonstrated [17]. A specific repertoire of 12 to 19 T3Es per strain of *Xap* and *Xff* strains has been determined [18]. However, a comprehensive characterization of all virulence factors in CBB agents remains to be proposed, and the genome deciphering of *Xff* and *Xap* strains is a first step in this direction.

CBB was first described in 1897 and the taxonomy of infecting strains is still debated since they are genetically diverse but share a common host (*Phaseolus vulgaris*) on which they induce the same range of symptoms. Among these strains, some produce a brown pigment on tyrosine-containing medium, therefore are called fuscous strains. The pigment results from the secretion and oxidation of homogentisic acid (2,5 dihydroxyphenyl acetic acid), an intermediate in the tyrosine catabolic pathway [19]. These strains are referred to as variant *fuscans* and are usually highly aggressive on bean [20,21] although the pigment itself has not been directly associated with pathogenicity [22,23]. Up to 1995, fuscous and non-fuscous strains responsible for CBB were grouped in a single taxon, namely, *X. campestris* pv. *phaseoli*. Genetic diversity of strains responsible for CBB was

demonstrated by rep-PCR [24], AFLP [25] and recently by MLSA [26]. Three genetic lineages (GL2, GL3 and GL*fuscans*) are phylogenetically closely related and belong to rep-PCR group 6 [27] while GL1 is phylogenetically distant and belongs to rep-PCR group 4 [25,26]. Following taxonomical revision of the *Xanthomonas* genus, this pathovar was transferred to *X. axonopodis*, fuscous strains forming a variant within this pathovar [2,3]. The current taxonomically valid nomenclature for the strains responsible for CBB is *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (*Xff*) for the fuscous strains, and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* for the non-fuscous strains [28]. Fuscous strains were first isolated by Burkholder from beans grown in Switzerland in 1924 [29] and have been isolated from every bean production area throughout the world since this date. The strain 4834-R is a highly aggressive strain that was isolated from a seed-borne epidemic in France in 1998 [13].

Twelve complete genome sequences of *Xanthomonas* are currently available and more than 90 draft *Xanthomonas* genomes (www.xanthomonas.org/genomes.html) are deposited in public databases. Altogether, genomes are available for strains representing 13 pathovars spanning over 11 *Xanthomonas* species. Most of the sequenced strains are pathogenic to five plant taxa (cabbage, cassava, citrus, rice, and sugarcane). No complete fully assembled genome sequence is yet available for any xanthomonads pathogenic to legumes. However the draft sequence of *X. axonopodis* pv. *glycines* strain 12-2, a pathogen of soybean, was recently made available (accession number: AJJO00000000). Common characteristics of previously released *Xanthomonas* genomes are to hold a great number of genes encoding proteins devoted to plant environment recognition such as methyl-accepting chemotaxis protein (MCP) and other sensors, to plant substrates exploitation such as TonB-dependent transporters (TBDT) and cell wall-degrading enzymes (CWDE), and to manipulation of plant defense machinery such as T3Es [30]. These bacteria contain genes encoding the six types of protein secretion systems so far described in Gram-negative bacteria. All these γ -proteobacteria are motile by a single polar flagellum. Motility is an important feature involved in plant colonization and is often considered as a pathogenicity factor. One motif of the bacterial flagellum (flg22) is a microbial-associated molecular pattern (MAMP) recognized by a transmembrane pattern-recognition receptor (FLS2) leading to PAMP-triggered immunity (PTI) [31]. Bean is known to harbor a FLS2-like gene, which expression is regulated following fungal infection [32].

Here, we provide the first whole-genome sequence of a *Xanthomonas* pathogenic on legumes. The high quality fully assembled and manually annotated genome sequence of *X. fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R (*Xff* 4834-R) reveals a strong potential for adaptation to

versatile environments, which appears to be a hallmark for xanthomonads.

Results and discussion

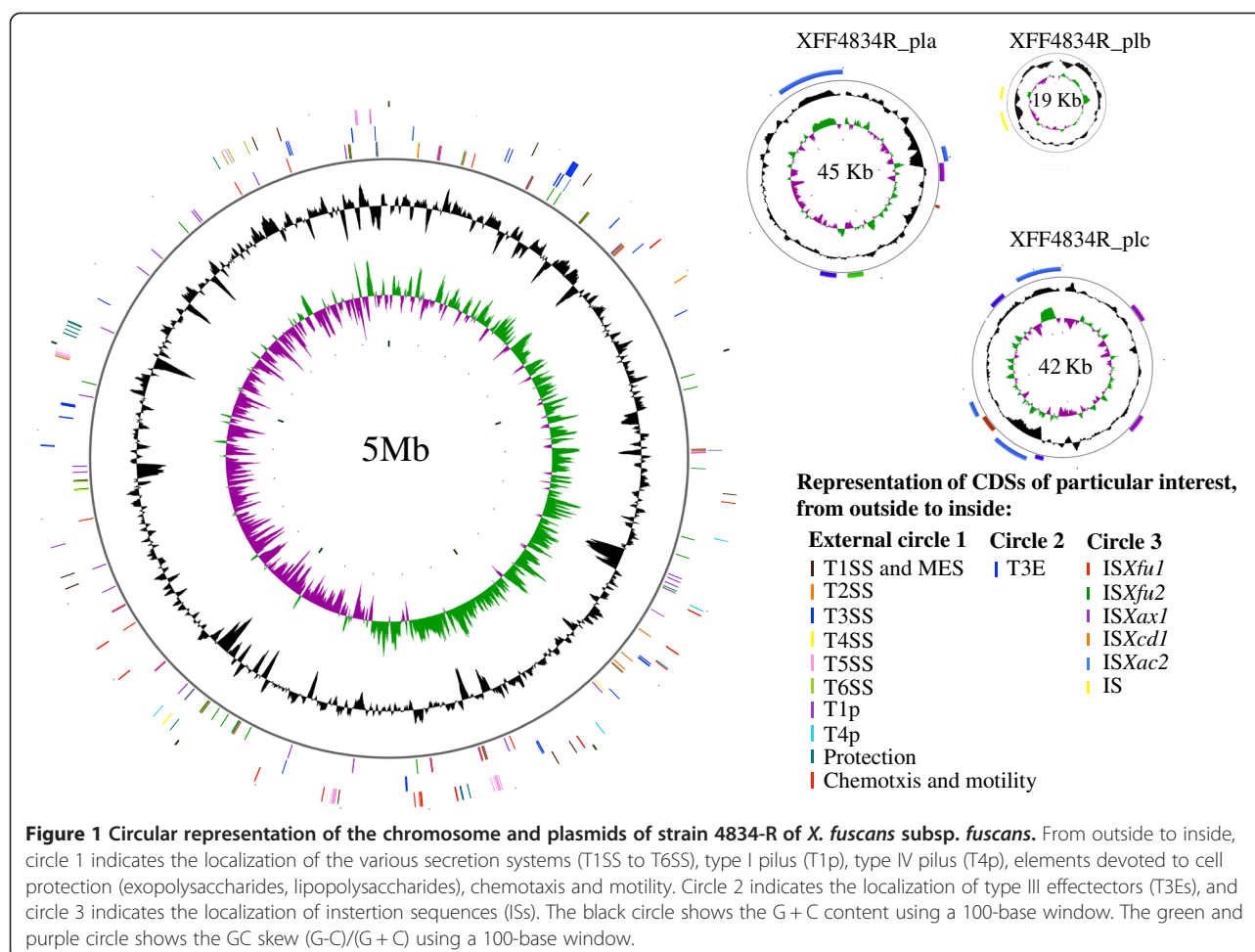
Xff 4834-R presents the classical general features of xanthomonads genomes

A high quality fully assembled sequence of the genome of *Xff* 4834-R was obtained by combining 454GS-FLX Titanium pyrosequencing (20X coverage), Illumina 36 bp (76X coverage) and Sanger (4X coverage) sequencing. The genome of *Xff* 4834-R is composed of a circular chromosome and three extrachromosomal plasmids (a, b and c) with a total size of 5 088,683 bp (Figure 1). The average GC content of *Xff* 4834-R chromosome is 64.81%, while average GC content of plasmids a, b and c are 61.32%, 60.64% and 60%, respectively. This high GC content is a common characteristic of most genera within the Xanthomonadaceae family [33]. The circular chromosome GC skew pattern is typical of prokaryotic genomes with two major shifts located near the origin and terminus of replication. The *dnaA* gene, which encodes a replication initiation factor promoting the unwinding of DNA at *oriC*, defines by convention the origin of the chromosomal sequence of *Xff* 4834-R. Annotation of the *Xff* 4834-R genome sequence revealed a total of 4,083 putative protein-coding sequences (CDSs), 137 pseudogenes, 127 insertion sequences (ISs), 54 tRNA and six rRNA genes. The rRNA genes (5S, 23S and 16S) are typically organized in two identical operons localized 463,865 bp apart. This genetic organization is a common characteristic of the other *Xanthomonas* strains sequenced (<http://xanthomonas.org/genomes.html>), with the exception of *X. albilineans*, which presents a reduced genome [34].

Of the 4,083 manually annotated CDSs, 3,021 have been assigned to putative functions based on homology with other known proteins and functional domain analyses (Table 1). Overall, automatic identification of clusters of orthologous groups of proteins (COGs) did not reveal any major difference in functions predicted in *Xff* 4834-R genome compared to the genomes of other *Xanthomonas* sp. (data not shown).

Xanthomonads pan-genome and comparative genomics

The pan-genome of a bacterial genus, species or group of strains is composed of a core genome (genes shared by all individuals) and a dispensable genome consisting of partially shared and strain-specific genes [36]. The dispensable fraction reflects the diversity of the group and may contain genes involved in the diversity of lifestyles [37], *Xanthomonas* pathogenicity, and adaptation to host and tissues [30,38,39]. Based on the phylogeny of the *Xanthomonas* genus [40] and the quality of the genomic sequences, we chose 12 other genomes to perform comparative genomics analyses with *Xff* 4834-R (Table 2).



These strains were chosen to represent different life-styles and different host / tissue specificities.

More than 80% of CDSs unique to Xff 4834-R encodes hypothetical proteins.

The 13 genomes of *Xanthomonas* have various sizes (containing between 3,028 and 5,027 CDSs) and totalize 56,614 CDSs. This *Xanthomonas* pan-genome includes orthologs, paralogs, and CDSs that are specific of each strain (Figure 2). The core genome of the 13 *Xanthomonas* genomes contains 1,396 groups of orthologs (18,148 CDSs), which are defined as copy-unique genes present in every genome and also 195 groups of homologs (3,117 CDSs), which are conserved in all strains but have at least one in-paralog in at least one strain. The *Xanthomonas* core genome represents in average 30% of any *Xanthomonas* genome. This value is high compared to the core genome size of the highly diverse *Lactobacillus*, which represents approximately 15% of any *Lactobacillus* genome [49]. The *Xanthomonas* core genome increases to 44% of any *Xanthomonas* genome once *X. albilineans* strain GPE PC73 (*Xal* GPE PC73) is

excluded of the analysis. This result is probably due to the markedly reduced genome of *Xal* GPE PC73 [34] and to its phylogenetic distance with all other *Xanthomonas* strains used in this study (Additional file 1).

The remaining CDSs (35,349) constitute the dispensable genome (3,270 groups of orthologs, 5,533 CDSs with paralogs, and 7,835 specific CDSs). The conserved fraction of the dispensable genome, *i.e.* CDSs present in 10 to 12 genomes, contains 1,591 groups of homologs (16,454 CDSs). The variable fraction, *i.e.* CDSs present in five to nine genomes, totalizes 782 groups of homologs (6,379 CDSs), whereas rare homologs, *i.e.* distributed in two to four genomes are in 1,581 groups (4,682 CDSs). Among those, pairwise comparisons of CDS contents in the sequenced genomes show a limited number of genes that are shared exclusively between two strains. As expected, the phylogenetically-closest strains share the highest number of CDSs (Additional file 1). In contrast, *Xff* 4834-R shares several CDSs with *Xal* GPE PC73. These genes have been probably acquired by horizontal gene transfert (HGT) events (Additional file 1). Indeed, most of these CDS (10/14) are located on

Table 1 Putative functions assigned to *Xff* 4834-R CDSs according to Riley classification [35]

Main functional class ¹	Gene ontology number (GO)	Number of CDSs
1. Metabolism	GO:0008152	1,248
1.1. Carbon compounds utilization		142
1.2. Macromolecules degradation	GO:0009057	151
1.3 Energy metabolism (carbon)	GO:0015980	83
1.4 Energy production/transport		57
1.5. Building block biosynthesis		260
1.6. Macromolecules biosynthesis	GO:0009059	214
1.7. Central intermediary metabolism		82
1.8. Metabolism of other compounds		20
2. Information transfer		371
3. Regulation	GO:0050789	360
4. Transport	GO:0005215, GO:0006810	489
5. Cell processes	GO:0009987	186
6. Cell structure	GO:0005575	34
7. Location of gene products	GO:0005575	199
8. Extrachromosomal		136
9. DNA sites		
10. Cryptic genes		1,060

¹ Only one putative functional class was assigned per CDS.

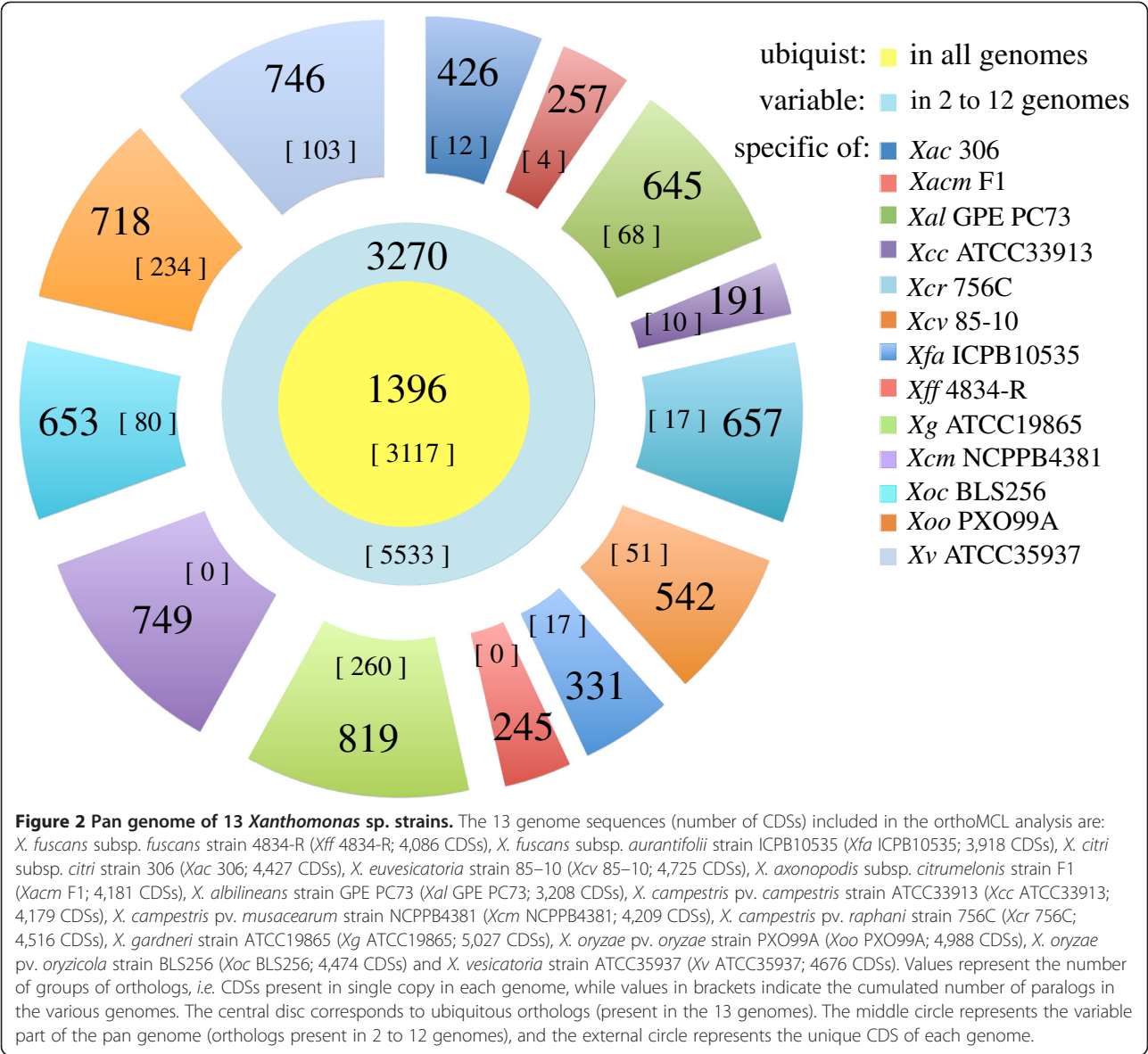
plasmids; the others being clustered on the chromosome (cf. LPS section). At least 6,979 unique CDSs and 856 specific CDSs with paralogs constitute the strain-specific fraction of *Xanthomonas* pan-genome. The number of strain-specific genes is variable within the 13 *Xanthomonas* genomes; *Xff* 4834-R displays one of the smallest fractions of specific genes (Figure 2). The specific *Xff* 4834-R CDSs mainly encode hypothetical proteins

(83.3% of the specific CDSs vs. 26% of the whole *Xff* 4834-R predicted proteome), a feature already observed in other comparative genomics analyses [36,50,51]. Regarding the origin of the *Xff*4834-R specific CDSs, 17.5% have a plasmidic origin and 15.9% are located in the vicinity of ISSs. However, only 1.6% of *Xff*4834-R specific CDSs are associated with phage insertion. In addition, some *Xff* 4834-R specific CDSs also encode the T3E XopT, several regulators, transporters and secreted proteins (Additional file 2). However, increasing the number of *Xanthomonas* genomes in the comparison should decrease the number of *Xff* 4834-R specific CDSs observed in this study. For instance, the gene *xopT* is present in the strains *X. oryzae* pv. *oryzae* strain KACC10331 and MAFF311018, which have not been used in our analysis. Moreover, the CDSs of the specific fraction of *Xff* 4834-R may be not conserved in other *Xff*-related strains. Therefore, the prevalence of *Xff* 4834-R specific genes among large collections of strains deserves further analysis. Genomic comparisons provide candidates for further functional studies of *Xff* host colonization

The genome of *Xff* 4834-R was compared to different bacterial genomic sequences in order to identify functions or putative CDSs involved in plant pathogenicity and adaptation to different ecological niches (Figure 3). To get insights into functions involved in plant pathogenicity, xylem and parenchyma adaptation, the genome of *Xff* 4834-R was compared to the genomic sequences of a non-pathogenic plant endophytic isolate, *Sm* R551-3, and a xylem-limited plant pathogen, *Xf* Temecula 1. Both strains belong to the Xanthomonadaceae family. *Xf* Temecula 1 presents a reduced genome and is insect-vectored [48,52]. Orthologs shared by *Xff* 4834-R and *Xf* Temecula 1 differ significantly in Riley functional classes [35] in comparison to the whole predicted proteomes

Table 2 List of genome sequences used in comparative genomics

Accession	Nomenclature	Strain code	Tissue specificity	Host	Reference
PRJNA58657	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (<i>Sm</i>)	R551-3	Non-pathogenic endophyte	Poplar	Unpublished
PRJNA43163	<i>Xanthomonas albilineans</i> (<i>Xal</i>)	GPE PC73	Vascular pathogen	Sugarcane	[34]
PRJNA73179	<i>X. axonopodis</i> subsp. <i>citrumelonis</i> (<i>Xacm</i>)	F1	Non-vascular pathogen	Citrus	[41]
PRJNA57887	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> (<i>Xcc</i>)	ATCC33913	Vascular pathogen	Brassicaceae	[42]
PRJNA55437	<i>X. campestris</i> pv. <i>musacearum</i> (<i>Xcm</i>)	NCPPB4381	Vascular pathogen	Banana	[43]
PRJNA159539	<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i> (<i>Xcr</i>)	756C	Non-vascular pathogen	<i>Brassica</i> spp.	[39]
PRJNA57889	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> (<i>Xac</i>)	306	Non-vascular pathogen	Citrus	[42]
PRJNA58321	<i>X. euvesicatoria</i> (<i>Xcv</i>)	85-10	Non-vascular pathogen	Tomato and sweet pepper	[44]
PRJNA47495	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> (<i>Xfa</i>)	ICPB10535	Non-vascular pathogen	Citrus	[45]
PRJNA63615	<i>X. gardneri</i> (<i>Xg</i>)	ATCC19865	Non-vascular pathogen	Tomato and sweet pepper	[46]
PRJNA153105	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (<i>Xoo</i>)	PXO99A	Vascular pathogen	Rice	[47]
PRJNA54411	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> (<i>Xoc</i>)	BLS256	Non-vascular pathogen	Rice	[39]
PRJNA63613	<i>X. vesicatoria</i> (<i>Xv</i>)	ATCC35937	Non-vascular pathogen	Tomato and sweet pepper	[46]
PRJNA57869	<i>Xylella fastidiosa</i> (<i>Xf</i>)	Temecula1	Vascular pathogen, insect-transmitted	Grapewine	[48]



(calculated $\chi^2 = 118.69$; $\chi^2_{0.01[8]} = 20.09$). For instance, CDSs involved in metabolism are enriched in the orthologous fraction shared between *Xff* 4834-R and *Xf* Temecula in comparison with the whole genomes (42.2% vs. 30.5%, respectively). Among them, there are CDSs involved in xanthan biosynthesis and several depolymerizing carbohydrates enzymes that could be involved in plant pathogenicity and xylem colonization. Orthologs shared by *Xff* 4834-R and *Sm* R551-3 also differ significantly in Riley functional classes in comparison to the whole predicted proteomes (calculated $\chi^2 = 100.53$; $\chi^2_{0.01[8]} = 20.09$). CDSs involved in regulation, transport, chemotaxis and motility are enriched in the orthologous groups shared by *Xff* 4834-R and *Sm* R551-3. These functional categories are generally abundant in metabolically versatile prokaryotes capable of survival in

complex and variable environmental niches, especially in nutrient-scarce environments [53]. This observation is in agreement with the ability of *Xff* to survive in the phyllosphere [13,16,17], an environment which is known to be nutrient-limited [54].

In order to identify functions putatively involved in tissue colonization, the genome sequence of *Xff* 4834-R was compared to the genome sequences of two rice pathogens *Xoo* PXO99A and *Xoc* BLS256. While *Xff* colonizes both the vascular system and the parenchyma of its host, *Xoo* PXO99A and *Xoc* BLS256 colonize specifically the vascular system and the parenchyma of their host, respectively. Orthologs shared by *Xff* 4834-R and *Xoc* BLS256 differ significantly in Riley functional classes in comparison to the whole predicted proteomes (calculated $\chi^2 = 180.08$; $\chi^2_{0.01[8]} = 20.09$). For example, CDSs

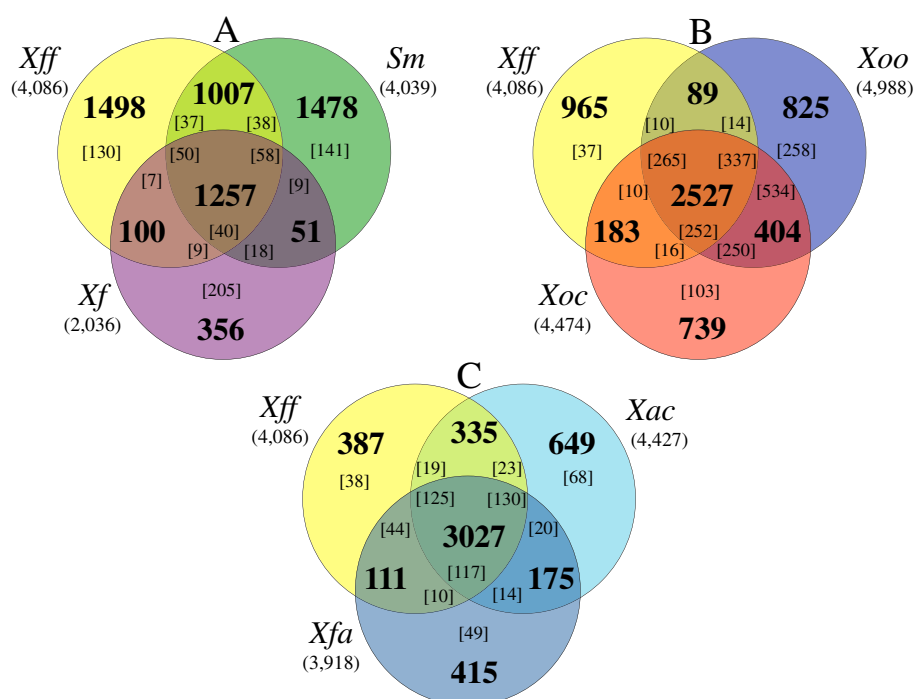


Figure 3 Venn diagrams illustrating the comparisons of xanthomonads genomes. Venn diagrams display the number of CDSs, which are present in single copy in each genome (in bold). In addition, values in brackets indicate the cumulated number of paralogs. **(A)** Comparison of the genomes of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R (*Xff*) and two distantly related strains: *Stenotrophomonas maltophilia* strain R551-3 (*Sm*), a non-pathogenic endophyte of poplar, and *Xylella fastidiosa* strain Temecula 1 (*Xf*), an insect-vectorized pathogen of grapevine. **(B)** Comparison of genomes of *Xff* 4834-R and two strains belonging to *X. oryzae*: *X. oryzae* pv. *oryzae* strain PXO99A (*Xoo*), a vascular pathogen of rice, and *X. oryzae* pv. *oryzicola* strain BLS256 (*Xoc*), a non-vascular pathogen of rice. **(C)** Comparison of genomes of *Xff* 4834-R with two phylogenetically close strains: *X. axonopodis* pv. *citri* strain 306 (*Xac*), a non-vascular pathogen of citrus, and *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* strain ICPB10535 (*Xfa*), a non-vascular pathogen of citrus.

involved in regulation (9 CDSs coding for two-component regulatory systems), in chemotaxis (7 MCPs), in biofilm formation (*xagBCD* and a putative filamentous adhesin CDS), and in pathogenicity (T3Es such as *xopAF* and *xopAK*) are enriched in the orthologous groups shared between *Xff* 4834-R and *Xoc* BLS256. Interestingly, *XopAF* and *XopAK* were previously suspected to be involved in tissue specificity of *Xoc* BLS256 [39]. Orthologs shared by *Xff* 4834-R and *Xoo* PXO99A differ significantly in Riley functional classes in comparison to the whole predicted proteomes (calculated $\chi^2 = 97.88$; $\chi^2_{0.01[8]} = 20.09$). CDSs involved in transport and of unknown function were enriched. Further analyses should give information on their putative role in *Xanthomonas* survival in the vascular system.

Comparison of *Xff* 4834-R with two citrus pathogens, *Xac* 306 and *Xfa* ICPB10535, phylogenetically closely related to *Xff* 4834-R should give insights into functions involved in host specificity and xylem adaptation since both *Xac* and *Xfa* are not vascular pathogens (Figure 3C). In this comparison, CDSs specific of *Xff* 4834-R show a distribution in Riley functional classes significantly different (calculated $\chi^2 = 1479.39$; $\chi^2_{0.01[8]} = 20.09$) from

their distribution in the whole genome and include numerous CDSs of unknown function (67.3% of the specific CDSs compared to the 26% of the CDSs of the whole genome), several T3E encoding genes (*xopF1*, *xopAM*, *xopC1*, *xopF2*, *xopJ2*, *xopT* and *xopG*) and a pectate lyase encoding gene. CDSs present in the specific fraction of *Xff* 4834-R could play a role in host specificity, as shown by the abundance of T3Es in this fraction. Indeed, repertoires of T3Es have been already pointed out as candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas* [18]. Further studies of CDSs specific of *Xff* will confirm if some candidates are involved in bean colonization.

Xanthomonads core functions are conserved in *Xff* 4834-R genome

Xff 4834-R is fully equipped for sensing the environment

Bacteria mainly detect environmental signals through Methylaccepting Chemotaxis Proteins (MCPs) and sensors of Two-Component Regulatory System (TCRS). MCPs are the principal components of the chemotaxis system. These transmembrane chemoreceptors direct cell locomotion by regulating the histidine kinase CheA,

which in turn communicates the information to the flagellar motor by phosphorylating its cognate response regulator CheY. In *Xanthomonas*, most MCPs are clustered in a region dedicated to chemotaxis and motility [42]. This cluster is highly similar within *Xanthomonas* with the exception of *X. albilineans*, which presents a reduced number of genes encoding MCPs [55]. Twelve MCPs are scattered on the chromosome of *Xff* 4834-R, among which eleven are also present in *Xcv* 85-10 and in most other *Xanthomonas*. The minor differences among *Xff* 4834-R and other *Xanthomonas* chemotaxis clusters concern the absence of XAC1897 and XCV1938 orthologs in *Xff* 4834-R genome.

TCRSs are major signal transduction pathways allowing bacteria to adapt to changing environmental conditions. A typical TCRS consists in a membrane-bound sensor histidine kinase (HK) that perceives external stimuli and a cognate response regulator (RR) that mediates the cellular response. Signal is transduced by successive phosphorylation reactions, as for chemotaxis [56]. The high number of TCRSs in *Xanthomonas* spp. confers to these bacteria a good adaptive potential compared to other bacteria [57-59]. *Xff* 4834-R genome is composed of 122 putative TCRSs according to their InterPro domains and using criteria defined in previous studies [58-60], including 38 transmembrane sensors, 21 sensor/regulator hybrids (Hy-HKs) and 63 RRs. The number of *Xff* 4834-R TCRSs (122) is similar to that of *Xcv* 85-10 (121). Sixty-two TCRSs correspond to pairs of sensor and cognate RR. Such an organization by pair is common in *Xanthomonas* and acquisition or loss is reported to occur for both elements at the same time, reflecting a probable process of co-evolution [58].

***Xff* 4834-R is fully equipped for biofilm formation and multiple stress resistance**

Biofilm formation allows bacteria to resist multiple stresses and requires, at least, attachment of cells and production of exopolysaccharide matrix. These individual characteristics also participate in bacterial virulence. Type IV pilus (T4P) is known to mediate a large array of functions, including twitching motility, adhesion, micro-colony formation, and virulence factors [61]. Twitching motility occurs through extension, attachment, and then retraction of the T4P. The T4P of *Xff* 4834-R is encoded by a large number of genes grouped in clusters scattered all over the genome with 24 out of 32 genes grouped in four main clusters. *Xff* 4834-R T4P belongs to T4a family, which is structurally related to type 2 secretion system (T2SS) [62]. The major pilin subunit *pilA*, as well as three *pilA*-related and one putative minor pilin subunit *pilE* genes are identified in *Xff* 4834-R genome. While synteny and identity are conserved for most genes involved in T4P synthesis among *Xanthomonas*, *pilQ* of

Xff 4834-R is disrupted by a frameshift (Additional file 3). Since PilQ is essential for type IV pilus secretion across outer membrane [63-65], it is tempting to speculate that the T4P of *Xff* 4834-R is unfunctional. However, the truncated PilQ of *Xff* 4834-R still contained a secretin domain (IPR011662) according to Interproscan software, thus suggesting that PilQ could still be functional in *Xff* 4834-R. This is in agreement with our previous study, which show that T4P should be functional in *Xff* 4834-R [16]. Indeed, a mutant deleted in *pilA* displayed altered adhesion capacities on bean seeds relative to wild-type 4834-R, and a decreased aggressiveness. Therefore either the frameshift observed in *pilQ* has no major consequences on the protein function, or alternative secretins such as XpsD and or XcsD are recruited.

Bacterial attachment, the first step of biofilm formation, depends mainly on adhesion factors such as T4P, Type 1 pilus, and non-fimbrial adhesins. *Xff* 4834-R genome possesses a cluster of genes encoding a Type 1 pilus, belonging to γ 1 fimbrial clade of the Chaperon-Usher system [66] and sometimes referred to as Type 7 secretion system [67]. This cluster (XFF4834R_chr30690- XFF4834R_chr30740) is highly similar to that of *Xac* 306 with two genes encoding the putative pili assembly chaperones, two genes encoding candidate structural fimbrial subunits containing each a spore coat U domain (IPR007893), and one gene coding a predicted usher protein, *i.e.* an outer membrane protein corresponding to the assembly platform. A conserved secreted hypothetical protein (XFF4834R_chr30730) is also predicted in this cluster as in *Xcc* ATCC33913 genome, *i.e.* between one gene coding a candidate structural fimbrial subunit and a putative pili assembly chaperone at the end of the cluster.

To date, the only identified non-fimbrial adhesins in xanthomonads are those secreted through one of the three Type 5 Secretion System (T5SS) subtypes: (i) monomeric autotransporters (T5aSS) [68], (ii) trimeric autotransporters or oligomeric coiled-coil adhesins (T5bSS) [69,70], and (iii) two-partner secretion systems including filamentous hemagglutinins (T5cSS) [71]. A total of nine adhesins potentially secreted by each of these subtypes are predicted in *Xff* 4834-R genome. The pattern of non-fibrillar adhesins encoded in *Xff* 4834-R genome is highly similar to that of *Xac* 306 [72] with two hemagglutinin-like YapH being monomeric autotransporters (encoded by XFF4834R_chr22670, XFF4834R_chr42170), two trimeric autotransporters homologous to YadA (XFF4834R_chr34400, XFF4834R_chr34420), one hemolysin called FhaC (XFF4834R_chr19440), and three filamentous hemagglutinins secreted through the two-partners pathway (XFF4834R_chr19450, XFF4834R_chr39820, XFF4834R_chr39830). One putative hemagglutinin (XFF4834R_chr19550), highly similar to HecA, may be non-functional as a frameshift was confirmed in the C-ter part of the predicted

peptide (Additional file 3). Functional evidence of the involvement in *in vitro* or *in planta* adhesion, biofilm formation, and virulence so far has been obtained for four of these non-fibrillar adhesins: YapH (XFF4834R_chr22670), XadA1 (XFF4834R_chr34400), XadA2 (XFF4834R_chr34420), and FhaB (XFF4834R_chr19450) [16]. They participate in the initial adhesion, three-dimensional structure of the biofilm and as a result, in the epiphytic fitness of the bacterium. A role of anti-virulence factor has been proposed for YapH in order to explain the higher aggressiveness of the mutant deleted of YapH in bean [16].

Exopolysaccharide (EPS) of *Xanthomonas* are mainly composed of xanthan, polymers of pentasaccharide repeating unit structures carrying at the non-reducing glucose residue a trisaccharide side-chain of varying extent of acylation [73]. Xanthan gum is the predominant component of the extracellular slime [74], a major component of the biofilm [75]. EPS are considered as determinants of disease as they induce the water-soaking in the intercellular space [76] and participate in wilt-induction for vascular pathogens [77]. Involvement in epiphytic fitness of strains belonging to various pathogens has also been demonstrated [78,79]. Xanthan is encoded by a cluster of 12 *gum* genes, *gumBCDEFGHIJKLM* [80]. In *Xff* 4834-R, the *gum* cluster (XFF4834R_chr26110 to XFF4834R_chr26220) is syntenic with those found in other *Xanthomonas* such as *Xcv* 85-10. A single nucleotide insertion in position 844 in *gumN* modifies the reading frame. In consequence, the TraB domain of the predicted protein is 60 aa truncated compared to functional orthologs in *Xanthomonas* sp. The 119 aa sequence in the C-terminal part of the predicted protein differs from those of the functional orthologs and is 59 aa longer than for other GumN predicted proteins in *Xanthomonas* sp. The gene *gumN* is also fragmented in *Xcv* 85-10 following the insertion of IS1477. In *Xoc* BLS256, a single base-exchange created a stop codon in the sequence resulting in two peptides (132 and 178 aa). Despite the co-transcription of *gumN* together with *gumB-gumM* operon in *X. oryzae* pv. *oryzae* [81], the role of *gumN* in xanthan biosynthesis is not demonstrated. The smooth aspect of *Xff* 4834-R colonies is consistent with a non-altered production of EPS. Pseudogenization of *gumN* had occurred independently in strains as different as *Xcv* 85-10, *Xoc* BLS256 and *Xff* 4834-R. This raises the question of the involvement of this gene product in the bacterial cycle?

Other genes, such as *xanA* (XFF4834R_chr34730) and *xanB* (XFF4834R_chr34740), also involved in xanthan biosynthesis [80,82], are present in *Xff* 4834-R as is the recently described *xagABC* operon (XFF4834R_chr34180 to XFF4834R_chr34200) [83]. Nevertheless, it should be noted that this latter cluster may not be functional in *Xff* 4834-R as the first gene of the operon, *xagA*, is

pseudogenized by an early stop codon at its two third of its length. In other *Xanthomonas*, the *xagA* gene is highly similar to that found in *Xcc* 8004 [83]. The *pgaABCD* operon of *Escherichia coli* (equivalent to the *hmsHFRS* of *Yersinia pestis*) is another operon known to be involved in the synthesis of polysaccharides. Homologs of these genes are found in *Xff* 4834-R genome (XFF4834R_chr19430 to XFF4834R_chr19470) and in *Xac* 306 but not in *Xcv* 85-10 neither in *X. campestris* genomes. Both the *PgaABCD* of *E. coli* and the *HmsHFRS* of *Y. pestis* are known to be involved in the synthesis of polysaccharide adhesins required for biofilm formation [84,85]. The role of these various genes in EPS biosynthesis and pathogenicity of *Xff* 4834-R remains to be investigated.

The lipopolysaccharide of *Xff* 4835-R and the genomic plasticity of the O-antigen encoding genes

Lipopolysaccharide (LPS) is one of the major components of the outer membrane (OM) of Gram-negative bacteria. This essential component confers peculiar permeability barrier properties to the OM, protecting bacterial cell from many toxic compounds. LPS is also known to interact with host cells, inducing innate immunity in both plant and animal host [86]. LPS is an amphipathic molecule consisting of a hydrophobic glycolipid anchor termed lipid A, a hydrophilic polysaccharide portion in the core region and the O-antigen polysaccharide chain [87]. CDSs (*lpsII*, *xanAB* and *ugd2*) involved in the biosynthesis of LPS precursors are clustered, except *pgi* and *galU* that are dispersed in the genome [80,88]. The cluster *rmlABCD*, which contributes also to the biosynthesis of the LPS carbohydrate precursors [80], is located downstream of *ugd2* in *Xff* 4834-R. The biosynthesis of the core-lipid A complex requires the convergent biosynthetic pathways of Kdo2-lipid A portion of LPS and of LPS outer-core involving nine and four genes, respectively [89], all present on the *Xff* 4834-R chromosome. The eight CDSs involved in the assembly and transport of LPS in Gram-negative bacteria [80,87-89] are also present in *Xff* 4834-R genome (*lptABCDEFG* and *msbA*).

The genomic plasticity associated with the O-antigen cluster is in accordance with previous comparative genomic studies [55,90] and might be due to intense diversifying selection and/or to HGT. Indeed, genes involved in O-antigen synthesis are present in a highly variable gene cluster and can be classified into three different groups: (i) O-unit-processing genes, (ii) genes involved in the synthesis of nucleotide sugars specially used as O-antigen residues, and (iii) genes encoding sugar transferases [91]. As in few strains of *E. coli*, *Xanthomonas* strains seem to process O-units via an ABC transporter pathway that involves Wzt and Wzm [90]. However, Wzt and Wzm

homologs in *Xanthomonas* strains display considerable variation ranging from 23 to 92% identities at the amino acid level, which is not in accordance with the phylogenetic relationships of the strains. Furthermore, the *Xff* 4834-R genes of the O-antigen precursors *gmd* and *rmd* are only shared with *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, *Xg* ATCC19865, *Xcc* ATCC33913 and *Xcv* 85–10. Distribution of sugar transferase genes is even more diverse in *Xanthomonas* strains. For instance, the bifunctional glycosyl transferases encoded by *wbdA1* and *wbdA2* has only true orthologs in *Xfa*, *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* and *Xcv* 85–10. In addition, five genes (*XFF4834R_chr34820* - *XFF4834R_chr34860*) are only shared with *X. axonopodis* pv. *malvacearum* and *Xal* GPE PC73. The homology of several contiguous CDSs of *Xff* 4834-R with those of *Xal* GPE PC73, which is not a closely related organism, may be indicative of an HGT event.

Nutrient acquisition and utilization

TonB-dependent transporters (TBDTs) are bacterial outer membrane proteins that allow active high affinity transport of large substrate molecules, among which iron-siderophore complexes, vitamin B12, and various carbohydrates [92-95]. TBDTs must interact with an inner membrane protein complex consisting of TonB, ExbB, and ExbD to get the proton motive force across the inner membrane to transport substrates [96]. The genome sequence of *Xff* 4834-R reveals a high number of TBDTs (70 including four pseudogenes and five CDSs with missing or incomplete functional domains) encoding genes. Such an overrepresentation of TBDTs is common in *Xanthomonas* sp. [93]. None of the TBDTs is specific of *Xff* 4834-R. Most *Xff* 4834-R TBDTs have orthologs in *Xac* 306 and many of them are conserved in xanthomonads, having also orthologs in *Xcc* ATCC33913. In *Xcc* ATCC33913, several TBDTs are part of CUT (Carbohydrate Utilization with TBDT) loci comprising also inner membrane transporters, degrading enzymes, and transcriptional regulators [93]. A CUT locus involved in sucrose utilization [93] is well conserved in *Xff* 4834-R. A second CUT locus, involved in the utilization of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) containing substrates [97], is almost complete in *Xff* 4834-R, except for the TBDT encoding gene *nixC*, which is a pseudogene. However, this latter CUT system could be functional as orthologs of three other TBDT encoding genes are present, namely *nixA*, *nixB* and *nixD*. Furthermore, orthologs of two other TBDTs associated with GlcNAc in *Xanthomonas* are also present in *Xff* 4834-R genome, *naxA* and *naxB* corresponding to *XFF4834R_chr14600* and *XFF4834R_chr14590*, respectively.

Finally, the four main CUT loci involved in plant xylan scavenging described in *Xcc* ATCC33913 are conserved

in *Xff* 4834-R genome [98]. The main loci involved in xylan utilization, namely *xytA*, *xylR*, *xytB* and *xyleE* loci, contain genes with putative functional orthologs in *Xff* 4834-R. The only exception is an alpha-D-glucuronidase encoding gene, which is a pseudogene in *Xff* 4834-R (*XFF4834R_chr41020 agu67A*). Diversity in depolymerizing enzyme gene content within CUT loci among strains having different host range may reflect their adaptation to various host plant carbohydrates.

Regulation of virulence factors

DSF cell-cell signaling pathway is involved in the regulation of many virulence factors such as EPS synthesis, type III secretion, extracellular hydrolytic enzymes [99] and in the reversion of pathogen-induced stomatal closure [100]. This pathway involves a small diffusible signal factor (DSF), the DSF synthetase RpfF and a TCRS RpfC/RpfG [99]. DSF signaling is tightly linked to the intracellular second messenger cyclic dimeric GMP (c-di-GMP) [101,102]. This major gene cluster comprises nine genes in *Xcc* 8004 [103], while only eight are predicted in *Xff* 4834-R. Indeed, *rpfI* which encodes a regulatory protein in *Xcc* [99] is lacking. This is also the case in *Xcv* 85–10, while in *Xac* 306 both *rpfH* and *rpfI* are lacking [42]. *Xylella fastidiosa* shows a partial *rpf* cluster, which nevertheless plays a key role in regulation and pathogenicity [104]. Mutation of *rpfI* does not significantly reduce the virulence of *Xoo* KACC10859 [105]. The *rpf* pathway is functional in *Xff* 4834-R and as expected an *rpfF* mutant shows an altered EPS production and displays rough colonies (our unpublished data).

Another diffusible signal molecule, DF, which was originally identified in *X. campestris*, was shown to be required for the production of xanthomonadin, EPS, systemic invasion, and H₂O₂ resistance, which are various biological processes that are crucial for bacterial survival and virulence [106,107]. DF is encoded by *xanB2* [108], a gene belonging to the xanthomonadin biosynthesis *pig* gene cluster [109], which was recently described as encoding a bifunctional chorismatase that hydrolyses chorismate into 3-hydroxybenzoic acid (3-HBA), the DF factor, and 4-HBA [110]. A *xanB2* mutant of *Xff* 4834-R presents, as expected, white colonies proving that the DF system is functional and involved in xanthomonadin production in this strain (data not shown). Biosynthesis of xanthomonadins is encoded by the *pig* cluster comprising about 20 CDSs, which may constitute part of a novel type II polyketide synthase pathway [110]. This *pig* cluster including *xanB2* is highly conserved among *Xanthomonas* [110] and *Xff* 4834-R did not depart from this rule. Gene content is highly conserved between *Xoo* PXO99A and *Xff* 4834-R, with the exception of orthologs to PXO_03724 and PXO_03725 (*XFF4834R_chr40750* and *XFF4834R_*

chr40740, respectively), which are located 133 kb away from the *pig* cluster. The yellow-pigmented colonies of *Xff* 4834-R prove that this system is functional.

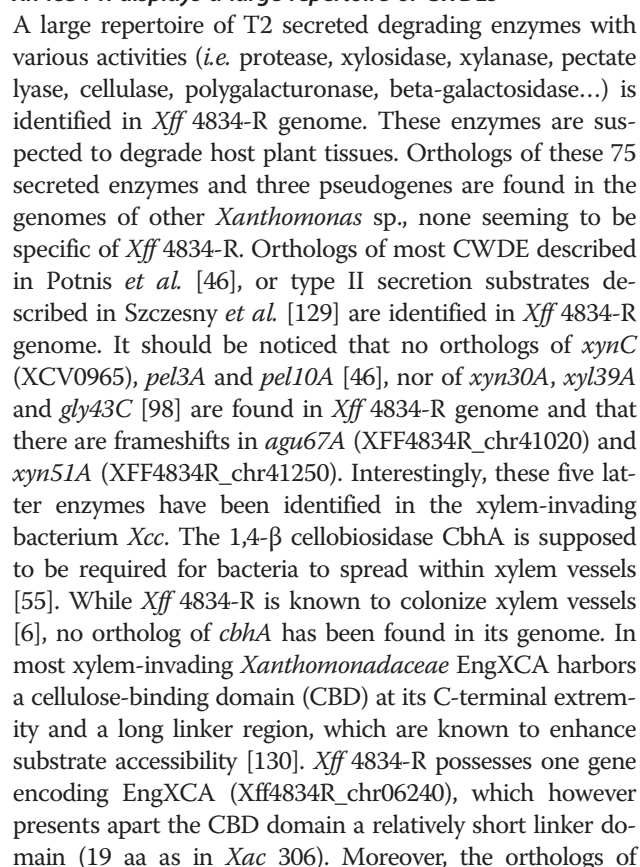
Genes encoding the six types of protein secretion systems are conserved in *Xff* 4834-R

Gram-negative bacteria use various basic pathways to secrete proteins, among which virulence factors, and target them to the proper compartment. Type I, III, IV, and VI secretion systems (T1SS, T3SS, T4SS, and T6SS) allow translocation of unfolded proteins directly from the cytoplasm to the outside or directly into the host cell cytoplasm. Pathways that translocate polypeptides across the cytoplasmic membrane include general secretory (Sec) and twin-arginine (Tat) pathways. Type II and V secretion systems (T2SS and T5SS) allow crossing the outer membrane from the periplasm. Genes encoding these six secretion systems have been identified in xanthomonads strains so far sequenced [15,55,111].

The T1SS exports in a single step to the extracellular medium a wide range of proteins of different sizes and activities such as pore-forming hemolysins, adenylate cyclases, lipases, proteases, surface layers, and hemophores [112]. The T1SS consists in three proteins: an inner membrane ATP binding cassette (ABC) protein, a periplasmic adaptor also named membrane fusion protein (MFP), and an outer membrane (OMP) channel of the TolC family. Two sets of genes encoding an ABC transporter, a MFP, and an OMP are found in clusters in *Xff* 4834-R genome (XFF4834R_chr29870 to XFF4834R_chr29890 and XFF4834R_chr24540 to XFF4834R_chr24600), constituting two putative T1SS. Furthermore, the OMP TolC (XFF4834R_chr11840) could be associated to three other putative T1SS composed by sets of genes encoding MFP and ABC transporters (XFF4834R_chr35340 to XFF4834R_chr35370, XFF4834R_chr38590 to XFF4834R_chr38640, and XFF4834R_chr40790 to XFF4834R_chr40810). Some T1SS-secreted substrates carry a secretion signal located at the extreme C-terminus [112] and secretion involves a multistep interaction between the substrate and the ABC protein that stabilizes the assembled secretion system until the C-terminus is presented [113]. One putative substrate of T1SS (XFF4834R_chr17340) carrying 2 repetitions of the motif GGXG XDXXX is detected, while 38 other putative substrates carry only one repetition of this motif. The role of Type 1 secreted proteins in *Xff* 4834-R pathogenicity remains to be demonstrated.

Because of a similarity in the structure of these systems, Multidrug Efflux Systems (MES) are sometimes considered as T1SS [114]. MES are grouped in five families depending on the primary structure and mode of energy-coupling [115]. MES belonging to the resistance-nodulation-division (RND) and multidrug and toxic

compound extrusion (MATE) families contribute significantly to intrinsic and acquired resistance to antimicrobials, but also to accommodate plant-derived antimicrobials (phytoalexins and isoflavonoids) and hence are of special interest for plant pathogens [116-119]. RND and MATE are secondary transport systems, which utilize an electrochemical gradient of cations across the membrane for drug transport. These MES consist in three components: a RND- or MATE-type exporter protein located in the cytoplasmic membrane, a gated OMP located in the outer membrane, and a MFP that links the exporter protein with the OMP. The drug transport is active and, in RND family, is driven by the proton motive force, while in MATE the drug efflux reaction is coupled with Na⁺ exchange [120]. *Xff* 4834-R genome contains seven tripartite RND-efflux pump system gene operons. Four other sets of consecutive RND exporter and the MFP coding genes could depend on *tolC* to assemble MES enabling export of drugs [112]. Two probable MATE transporters, including NorM, are identified in *Xff* 4834-R genome. In *Ralstonia solanacearum*, the RND pump AcrA and the MATE pump DinF contribute to its overall aggressiveness, probably by protecting the bacterium from the toxic effects of host antimicrobial compounds [117]. The role of these MES in *Xff* 4834-R as in other *Xanthomonas* remains to be analyzed and described. To be secreted through the T2SS and T5SS, proteins are first exported into the periplasmic space via the universal Sec or Tat pathways. The machinery of the Sec pathway recognizes a hydrophobic N-terminal leader sequence on proteins destined for secretion, and translocates proteins in an unfolded state, using ATP hydrolysis and a proton gradient for energy [121]. The *tat* and the *sec* genes are highly similar in identity and organization to those found in *Xcv* 85-10 genome. The *sec* genes are dispersed all over the genome and *secM* is absent in *Xff* 4834-R genome as it is in *Xcv* 85-10. Microsynteny and similar positions on genomes are conserved for the two T2SS (*xcs* and *xps*) identified in *Xff* 4834-R genome with orthologous clusters in *Xcv* 85-10. The T3SS encoded by the *hrp* gene cluster is a key pathogenicity factor in xanthomonads, with the exception of *X. albilineans* [55]. It is involved in the secretion and translocation of effector proteins directly into the host cell cytoplasm. In *Xff* 4834-R, the *hrp* gene cluster is inserted next to an arginine transfer-RNA (tRNA-Arg). One copy of IS*Xfu*2 (see below for IS*Xfu*2 description) is localized at each side of this cluster, which otherwise is almost identical and syntenic to that of other sequenced *Xanthomonas* strains (Figure 4). Genes coding the master regulators HrpG (XFF4834R_chr32700) and HrpX (XFF4834R_chr32690) are localized 3.3 Mb away from the *hrp* cluster. This type III secretion system was shown to be functional and



X. albilineans genes coding CelS and XalC_0874 present neither long linker regions nor CBD in *Xff* 4834-R genome. This is also the case for other *Xanthomonas* [55]. Such differences in depolymerizing enzyme content between these two xylem-invading bacteria (*Xcc* and *X. albilineans*) and *Xff* may reflect a relatively limited ability of *Xff* to colonize xylem vessels, which is in accordance with infrequent vessel obstructions, necrosis, and wilting symptoms.

Xff 4834-R harbors a specific repertoire of putative T3Es

To mine for the presence of genes coding candidate T3Es (including T3 secreted proteins, T3SPs), we first blasted on the genome of *Xff* 4834-R the sequence of all known T3Es genes listed on the *Xanthomonas.org* website. Such a mining of the genome of *Xff* 4834-R predicts 29 genes encoding T3E orthologs (Table 3), thereby revealing a T3E repertoire larger than previously described

Table 3 List of T3Es and T3SP identified in *Xff* 4834-R genome and their characteristics

T3E / T3SP	Synonyms	Function / features	accession	GC%	Flanking sequences: IS, ARNt, integrase
Located on the chromosome					
AvrBs2	.	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	XFF4834R_chr00460	63.60	integrase
XopA	Hpa1/HpaG	"Harpin,"	XFF4834R_chr41750	60.00	IS4
XopAD	.	SKWP repeat protein	XFF4834R_chr40870	66.40	no
XopAE	HpaF/HpaG	LRR protein	XFF4834R_chr38990	63.60	tRNA-Arg
XopAF	AvrXv3	Unknown	XFF4834R_chr42650	49.00	transposase mutator type
XopAK	.	Unknown	XFF4834R_chr35620	58.60	no
XopAM	.	Unknown	XFF4834R_chr33550	65.30	no
XopC2	.	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	XFF4834R_chr33300	63.20	no
XopE1	AvrXacE1	Putative transglutaminase	XFF4834R_chr02600	63.40	no
XopF1	Hpa4	Unknown	XFF4834R_chr03180	63.60	no
XopF2	.	Unknown	XFF4834R_chr18460	63.30	no
XopG	.	M27-family peptidase (Clostridium toxin)	XFF4834R_chr10930	51.10	mutator type transposase
XopI	.	F-box protein	XFF4834R_chr07620	65.10	no
XopJ5	AvrXccB	Putative C55-family cysteine protease or Ser/Thr acetyltransferase (Clan CE)	XFF4834R_chr16310	59.40	no
XopK	.	Unknown	XFF4834R_chr15450		no
XopL	XAC3090	LRR protein	XFF4834R_chr15400	61.90	no
XopN	.	ARM/HEAT repeat	XFF4834R_chr18430	63.30	no
XopP1	.	Unknown	XFF4834R_chr33320	61.60	no
XopP2	-	Unknown	XFF4834R_chr33310	60.10	no
XopQ	.	Putative inosine-uridine nucleoside N-ribohydrolase	XFF4834R_chr42130	67.50	no
XopR	.	Unknown	XFF4834R_chr25420	66.50	no
XopT	.	Unknown	XFF4834R_chr23790	64.60	IS3/IS911; transposase mutator type
XopV	.	Unknown	XFF4834R_chr42980	62.90	no
XopX	.	Unknown	XFF4834R_chr42980	65.60	no
XopZ	.	Unknown	XFF4834R_chr21120	65.50	recombination factor <i>rara</i>
Located on plasmids					
XfuTAL1	"Pth, TAL"	AvrBs3/PthA-type transcription activator; 31,5 repeats of 34 aa. RVDs: NI NN NN HD NI HD HD HD HD NI NG NI NG NI NN NG NN HD HD NF HD NI HD HD HD HD NG NG	XFF4834R_plb00200	66.80	IS3; ISXac2; Tn3 fragment; ISXco11; IS3/IS911
XfuTAL2	"Pth, TAL"	AvrBs3/PthA-type transcription activator; 16,5 repeats of 34 aa. RVDs: NI NG HD NG HD NI NG NI HY NN N- HD NG HY NN HD NG	XFF4834R_pla00470		
XopC1	.	Phosphoribosyl transferase domain and haloacid dehalogenase-like hydrolase	XFF4834R_plb00200	47.80	Tn3 fragment; ISXco11
XopE3	AvrXacE2	Putative transglutaminase	XFF4834R_plb00200	59.40	Tn3 fragment; ISXco11

[18]. Most genes encoding T3Es are located in the chromosome; only 5 genes encoding T3Es are plasmidic (Table 3). As well, a pseudogene similar to the 5'-end of *xopF2* and an extra pseudogenized version of *xopAD* may be found on the chromosome. Among the genes encoding T3Es found in the genome of *Xff* 4834-R, six have orthologs in all sequenced strains of *Xanthomonas* possessing an hrp-T3SS. Based on such an observation, a core effectome of the genus featuring *xopN*, *xopQ*, *xopF*, *xopX*, *avrBs2* and *xopPI* can be defined.

Many T3Es are located in the vicinity of various types of mobile genetic elements such as ISs or integrases in *Xff* 4834-R genome (Table 3). Interestingly, the locus carrying *xopG* contains numerous ISs on both sides of *xopG*. This locus is found in the vicinity of tRNA genes. Such genetic organization is also observed in other *Xanthomonas* genomes including *Xcv* 85-10 and *Xcc* B100. Interestingly, in the genome of *Xcc* 8004, *xopG* is pseudogenized and only one IS can be found flanking *xopG* on one side. In the genome of 4834-R, *xopG* displays a significant GC bias since the average GC content dropped to 51.1%. The predicted XopG protein belongs to the M27 family of metalloproteases. Two CDSs are located between *xopG* and *ISXfu1*. These CDSs display a GC content of 61 and 60% respectively, which remains lower than the average value in the rest of the genome (65%). The CDS XFF4834R_chr10940 encodes a putative glyoxalase that may participate in stress resistance. The CDS XFF4834R_chr10950 encodes a protein that shares structural similarity with peptidases from the M48 family. Altogether, this suggests that *xopG* is carried by a small pathogenicity island that could be transferred by HGT.

The genome of *Xff* 4834-R also features a CDS resembling the N-terminal part of *xopF2*, right upstream a complete allele of *xopF2*. Such CDS may constitute an ORPHET for terminal reassortment of novel T3Es [131]. As well, on the positive strand, CDSs Xff4834R_chr40850 and Xff4834R_chr40860 encode truncated C-terminal and N-terminal parts of XopAD, respectively. These CDSs are located right upstream a full copy of *xopAD*. The N-terminal part of XopAD features numerous repeats of a 42-residue motif identified as SKWP repeats. The N-terminal part of the full version of XopAD differs from Xff4834R_chr40860 by three indels covering five entire repeats. On the contrary, CDS Xff4834R_chr40850 shares 100% identity at the amino acid level with the C-terminal part of the full *xopAD* copy. Such an observation suggests that CDSs Xff4834R_chr40850 and Xff4834R_chr40860 constitute two functional domains that may evolve separately. The C-terminal part may then be reassorted with various N-terminal parts.

Plant-inducible promoters, also called PIP-boxes, are cis-regulatory motifs recognized by the transcriptional activator HrpX that controls the expression of T3SS and

T3Es [132]. PIP boxes are located between 30 and 32 bp upstream the -10 motif of the promoter [133]. Therefore, to mine for potentially novel candidate T3Es and genes expressed in an *hrpX*-dependent manner in the genome of *Xff* 4834-R, we identified the occurrence of the previously described PIP-boxes and -10 motifs [134]. PIP-boxes matching the previously described patterns could be identified upstream *xopA*, *xopAM*, *xopAF*, *xopE1*, *xopJ2*, *xopJ5*, *xopK*, and *xopR*. The putative PIP boxes upstream *xopA*, *xopAM*, *xopAF*, *xopJ2*, *xopJ5*, and *xopR* were located far upstream the translational start codon of the respective CDS (94 bp, 573 bp, 144 bp, 262 bp and 405 bp respectively, Additional file 4). Such an observation suggests the occurrence of very long 5'-UTRs for these genes, as already observed by Schmidtke et al. [135].

Looking at CDSs downstream putative PIP-boxes may reveal sequences corresponding to yet unidentified T3Es, as well as functions co-regulated with type III secretion (Additional file 4). Among CDS found downstream PIP boxes, CDS XFF4834R_chr23750, encoding a putative Serine/cysteine protease, could be a good candidate T3E. Genes coding for two putative polygalacturonases and a secreted lipase may be found downstream PIP boxes, suggesting that cell wall degradation is co-regulated with type III secretion. Cell to cell bacterial communication may also be partly co-regulated with the type III secretion. Indeed, the gene *trpE* encoding a probable anthranilate synthase component is also found among genes located downstream putative PIP-boxes. The involvement of anthranilate synthases in the production of quorum signals controlling the production of virulence factors was recently documented in *Pseudomonas aeruginosa* [136].

Eight types of insertion sequences (ISs) are present in *Xff* 4834-R genome

A total of 127 IS copies are present in the genome of *Xff* 4834-R. Among those, only 79 appear to be complete (Additional file 5) and are split into five isoforms: *ISXax1* [137], *ISXfu1* (<https://www-is.biotoul.fr/> accession number: FO203524), *ISXfu2* (<https://www-is.biotoul.fr/> accession number: FO203525), *ISXcd1* (AF263433), and *ISXac2* [42], and three types of degenerated ISs (belonging to IS3-, IS5-, and IS1595- families) [137]. *ISXfu1* has not yet been identified in any other sequenced genome but an isoform was previously sequenced (accession number: AY375317) from another bean-associated xanthomonads strain. There are 26 insertions or remnants of *ISXfu1* found all over *Xff* 4834-R chromosome, none are plasmidic. There are 33 insertions of *ISXfu2* in *Xff* 4834-R genome. No complete copy of *ISXfu2* is identified so far in other xanthomonads genomes. However, exact copies of the transposase TXfu2 are present in *Xfa* ICPB10535 translated genome.

Overall, *Xff* 4834-R contains more ISs than *Xac* 306 [138] and less ISs than *X. oryzae* strains [47]. *ISXax1* is

the most abundant IS in *Xff* 4834-R genome and belongs to IS256-family [137]. Members of this family are plasmidic in *Xac* 306 and *Xcv* 85–10 but are present in multiple chromosomal copies in the four sequenced strains of *X. oryzae* [30]. Integration and dissemination of *ISXax1* in *Xff* 4834-R chromosome may have occurred with the partial integration of pXCV38 plasmid (see below).

Furthermore, 12 remnants of ISs belonging to several families are also inserted in *Xff* 4834-R genome (Additional file 5). These degenerated elements are probably not functional anymore. Most remnants colocalize with other IS elements. These interdigitations of various intact or partial IS elements has been noted repeatedly in the literature [139] This may reflect the scars of consecutive but isolated transposition events resulting from selection for acquisition or loss of accessory genes.

Occurrence of other mobile genetic elements inserted into the chromosome of *Xff* 4834-R

Several predicted viral DNA genes and fragments are found all over the genome of *Xff* 4834-R (Additional file 5). A DNA region of more than 6,500 bp contains 10 CDSs of phage-related proteins including one copy of the ϕLf filamentous phage. The CDS (XFF4834R_chr22400) coding the integrase of the ϕLf phage [140] is disrupted indicating that the protein should not be functional anymore. Two contiguous and symmetric copies of this phage are found in *Xcc* ATCC33913 genome [141]. In *Xff* 4834-R downstream of the complete ϕLf insertion, a truncated copy of ϕLf “orf112” is found contiguous to two consecutive insertions of *ISXax1*. This suggests that *ISXax1* insertions could be posterior to ϕLf integration and could have deleted most part of the second ϕLf integration, from which only the truncated “orf112” remained.

In addition, a chromosomal DNA region of more than 30 Kb contains CDSs that are orthologous to CDSs of plasmidic origin in other *Xanthomonas*. Half of this region (17 CDSs) is syntenic to a part of pXcB from *X. citri* pv. *aurantifolii* strain B69 [142], and 12 CDSs are syntenic to a part of pXCV38 from *Xcv* 85–10. Some CDSs of these two parts of the native plasmids are orthologous but the copies found in *Xff* 4834-R genome have higher identities with pXCV38 copies (Additional file 5), suggesting that they originate from pXCV38 rather than pXcB. It is worthwhile to mention that *pthB* from pXcB is not conserved in *Xff* 4834-R while its two adjacent CDSs are. This T3E, PthB, is required to cause cankers on citrus [142,143]. However, the gene encoding another T3E, *xopAF*, is inserted in this region together with *ISXax1* and *ISXfu2*. Orthologs of both *xopAF* and *Txfu2* are found by Blastp only in *Xfa* ICPB10535 genome. The association *xopAF* –*ISXax1* is unique to *Xff* 4834-R and is not found in other xanthomonads genomes. *ISXax1* is present in the native pXCV38 [137]

and hence could have transposed from this plasmid during its integration into *Xff* 4834-R chromosome.

Mobile genetic elements co-localize with two major chromosomal inversion events, one large DNA deletion event, and various gene insertions

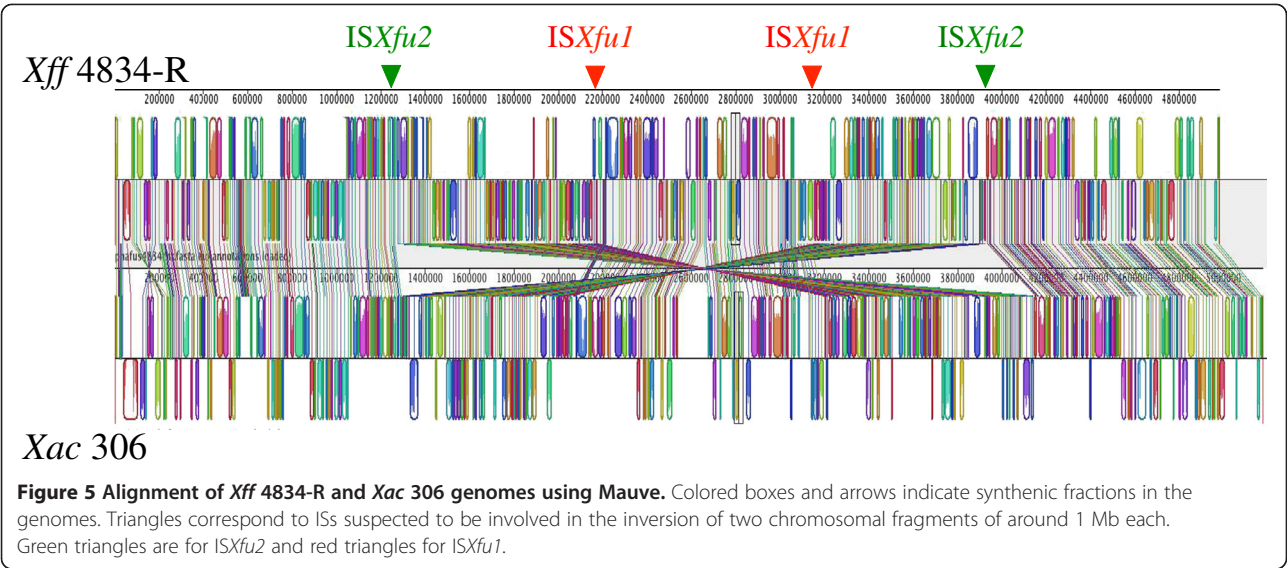
Half of the IS insertion events are distributed all over the genome while the other insertions are grouped in spots of two to six ISs (Figure 1). This non-random distribution of IS elements is common in bacterial genomes [30]. *ISXfu1* is involved in 13 IS hot spots together with *ISXax1* and in a lesser extent with *ISXfu2* and other IS remnants. Five other IS spots involved only *ISXfu2*, *ISXax1*, and IS remnants. *Xff* 4834-R ISs are associated with two major chromosomal inversion events, one large DNA deletion event, various gene transfers, and several gene breakdowns.

Two major chromosomal inversions co-localize with *ISXfu1* and *ISXfu2*.

A dramatic pattern of genomic rearrangement consisting in two inversion events involving *ISXfu1* and *ISXfu2* is revealed by comparison with the most closely related assembled genome (*Xac* 306 genome) (Figure 5). The combination of various sequencing approaches that we used ensures a high quality of the assembly and we can therefore rule out that such an inversion would originate from an error in the assembly. A considerable colinearity exists among xanthomonads genomes allowing inversion events to be easily detected, as was previously observed between *Xcc* ATCC33913 and *Xcc* 8004 [141]. Two copies of *ISXfu1* (at positions 2,165,981 and 3,152,577) and two copies of *ISXfu2* (at positions 1,270,755 and 3,930,499) flank the inverted segments that are located symmetrically at mirror image positions across the replication axis. Consequently, the GC skew pattern is not altered by these inversions (Figure 1). These inversions result in an inverted order of CDSs and coding strand in *Xff* 4834-R compared to the other *Xanthomonas* on the length of these two regions of around 1 Mb each (Figure 5).

A large deletion in the flagellar gene cluster in *Xff* 4834-R genome is associated with *ISXfu2*

Annotation of the flagellum cluster reveals that a group of 34 contiguous genes is lacking in *Xff* 4834-R genome compared to *Xcv* 85–10 genome. Instead of these genes, a complete copy of *ISXfu2* is inserted in *Xff* 4834-R genome (Figure 6). Notably, genes coding for the periplasmic rod and its rings, the hook, and the filament are lacking. These elements are essential for flagellum biosynthesis [144]. As suspected in the absence of a functional flagellum, no swimming motility can be observed for this strain in a soft-agar assay (Figure 7). This is a surprising observation, as xanthomonads are known to

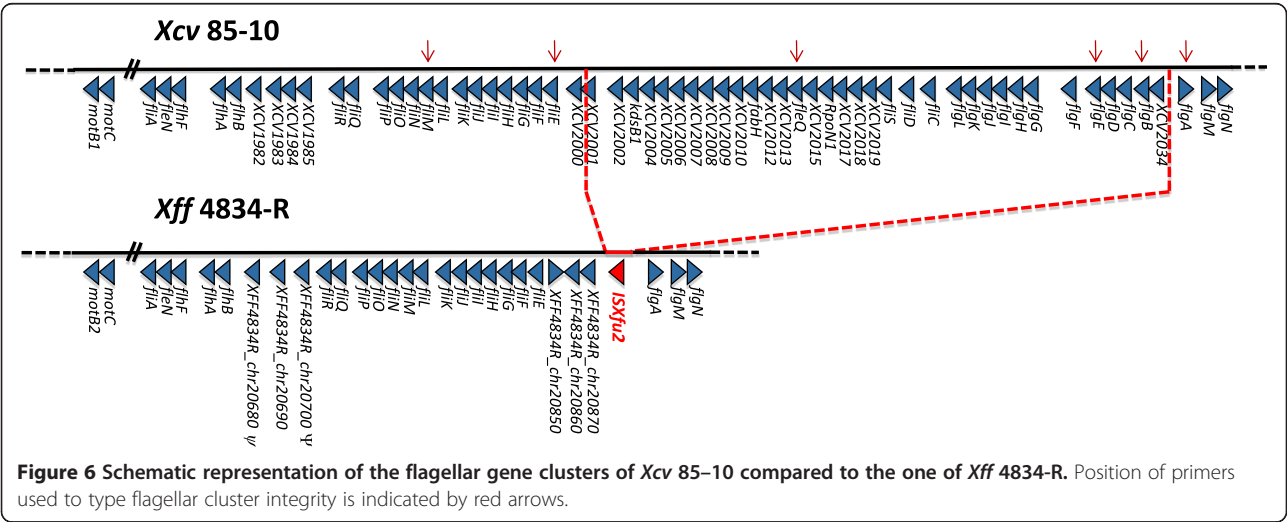


be motile by means of a single polar flagellum [145]. However, as we obtained a high quality fully assembled genome, this fragment absence could not be due to sequencing errors or assembling problems. No such flagellar deletion was observed so far in any other complete assembled genome sequence of any xanthomonads. On the contrary, the flagellar cluster is highly conserved among microbes. In particular, elements such as the Flg22 peptide are usually described as canonical microbial associated molecular patterns (MAMPs) involved in the induction of the first layers of plant defense [146].

Absence of motility is not restricted to the strain Xff 4834-R and involves several species within the Xanthomonas genus
To determine if the event leading to a non-functional flagellum system is strain specific, pathovar specific or if, in contrast, it could be observed in other species of the

genus, markers of the integrity of the flagellar cluster were searched for in several collections. To do so, seven consensus primers pairs (Additional file 6) were designed and used for PCR-amplification of genes regularly dispersed all over Xcv 85–10 flagellar cluster (Figure 6).

A collection of 190 strains, mostly type strains representing most species and numerous pathovars within the Xanthomonas genus except CBB agents was initially used. For most strains, signals at the expected sizes were generated indicating that these strains should harbor complete flagellar cluster. However, some PCR were negative for seven strains that belong to six different species (Table 4a). Since several PCR tests were negative in each strain, this strongly indicates that one or several groups of genes could be missing. Different patterns of deletions are observed. Their impact on motility of strains was tested using soft-agar assays. None of these



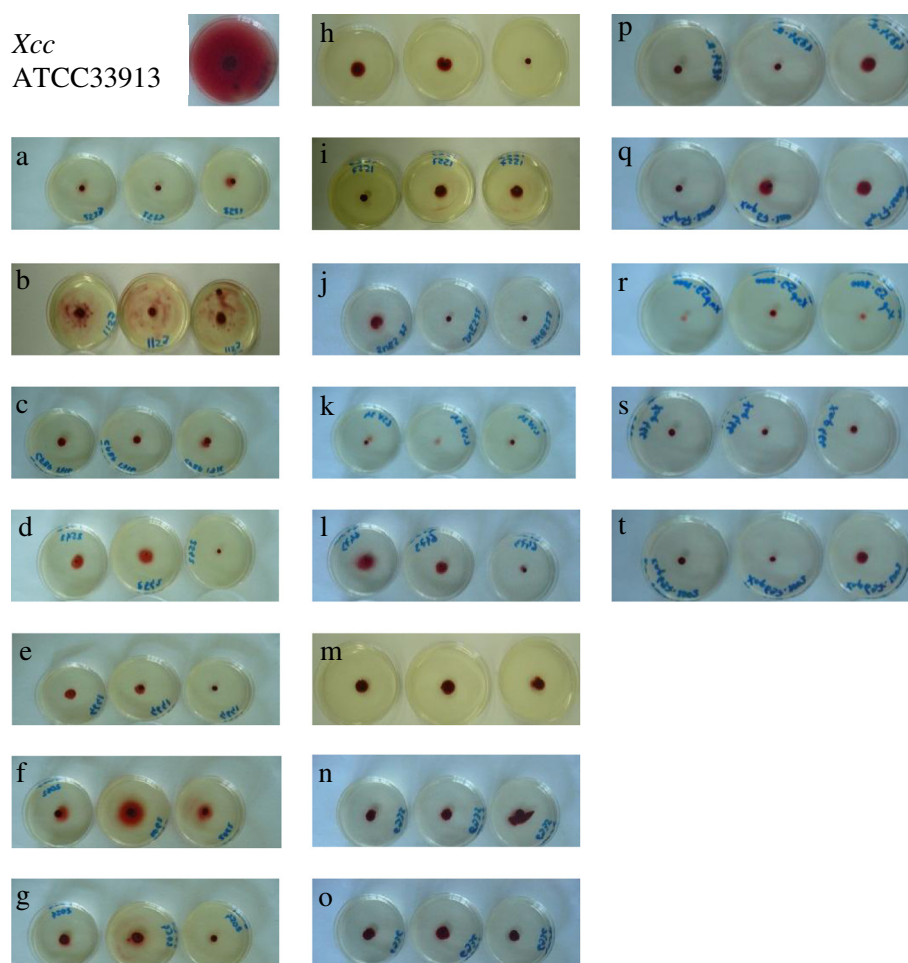


Figure 7 Non-motility of some xanthomonads strains. Illustration of non-motility as determined by soft-agar (0.2%) motility tests imaged five days after inoculation in MOKA medium containing tetrazolium chloride. The non-motile strains are **a)** *X. albilineans* CFBP 2523, **b)** *X. arboricola* pv. *corylina* CFBP 1159, **c)** *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* CFBP 1716, **d)** *X. cucurbitae* CFBP 2542, **e)** *X. saccharii* CFBP 4641, **f)** *X. translucens* pv. *phlei* CFBP 2062, **g)** *X. translucens* pv. *translucens* CFBP 2054, **h)** *Xff* 4834-R, **i)** CFBP 1557, **j)** SNES 22, **k)** LSV24, **l)** CFBP 6473, **m)** CFBP 6546, **n)** CFBP 6935, **o)** CFBP 6936, **p)** *Xff* 4885, **q)** Xap57, **r)** Xap59, **s)** Xap466, and **t)** Xap697. The motile *Xcc* ATCC33913 strain is used as positive controls in these tests.

seven strains are motile (Figure 7a to g). Among these, the pathotype strains of *X. translucens* pv. *phlei* and *X. translucens* pv. *translucens* are not motile (Table 4 and Figure 7f and g). Moreover, the genomes of two strains belonging to *X. translucens* were recently made publicly available and also show partial or entire deletion of the flagellar cluster (Table 5), suggesting that they are also non-motile. The genome of *X. translucens* pv. *graminis* ART-Xtg29 has not one single orthologous gene (CDS with more than 80% identity on more than 80% of the length) of any gene from *Xcv* 85–10 flagellar cluster. In the genome of *X. translucens* pv. *translucens* DSM 18974, six CDSs from the flagellar cluster-I encoding protein involved in flagellar structure are lacking, thereby probably altering the motility of the strain [147]. The absence of motility could hence occur in a wide range of species or pathovars within the genus *Xanthomonas*.

Distribution of non-motile strains was also assessed in a collection of 148 strains representing the four genetic lineages (*X. axonopodis* pv. *phaseoli* GL1, GL2, GL3, and *Xff*) of the agents responsible for the common bacterial blight of bean. While 95% of the strains harbor a complete flagellar cluster, eight strains possess an incomplete flagellar cluster (Table 4b). Three patterns of deletion were identified. One pattern is found in several strains from the GL1 isolated in the Americas over a large period of time and another pattern is found in fuscos strains isolated from different places in France over a period of 30 years. Absence of motility was, once again, confirmed by phenotyping the strains with soft-agar motility tests (Figure 7h to o).

In order to assess the prevalence of non-flagellate strains in natural environments, 12 strains isolated from the same epidemic than *Xff* 4834-R were screened for

Table 4 Flagellar cluster integrity in a collection of 338 strains of *Xanthomonas* spp

a <i>Xanthomonas</i> collection except common bacterial blight agents											
Taxon	# or code of strains	Geographical origin	Host	Year of isolation	<i>fliM</i>	<i>fliE</i>	<i>fleQ</i>	<i>fliC</i>	<i>flgE</i>	<i>flgB</i>	<i>flgA</i>
<i>Xanthomonas</i> spp.	183 strains	Diverse	Diverse	Diverse	1	1	1	1	1	1	1
<i>X. albilineans</i>	CFBP 2523	Fidji Island	<i>Saccharum officinarum</i>	1961	1	1	1	0	0	0	0
<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	CFBP 1159	USA	<i>Corylinus maxima</i>	1939	0	0	0	1	1	1	1
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	CFBP 1716	India	<i>Mangifera indica</i>	1957	0	0	1	1	1	1	1
<i>X. cucurbitae</i>	CFBP 2542	New-Zealand	<i>Cucurbita maxima</i>	1968	1	1	0	1	0	0	0
<i>X. saccharii</i>	CFBP 4641	France	<i>Saccharum officinarum</i>	1980	1	1	0	1	0	0	0
<i>X. translucens</i> pv. <i>phlei</i>	CFBP 2062	Switzerland	<i>Phleum</i> sp.	1978	1	1	0	1	0	0	0
<i>X. translucens</i> pv. <i>translucens</i>	CFBP 2054	USA	<i>Hordeum vulgare</i>	1933	1	1	0	1	0	0	0
b. Common bacterial blight agent collection											
Genetic lineage	# or code of strains	Geographical origin	Host	Year of isolation	<i>fliM</i>	<i>fliE</i>	<i>fleQ</i>	<i>fliC</i>	<i>flgE</i>	<i>flgB</i>	<i>flgA</i>
1, 2, 3, <i>fuscans</i>	140 strains	Diverse	Diverse	Diverse	1	1	1	1	1	1	1
<i>fuscans</i>	4834-R	France	<i>P. vulgaris</i> cv. Michelet	1998	1	1	0	0	0	0	1
<i>fuscans</i>	CFBP 1557	France	<i>P. vulgaris</i> cv. Michelet	1974	1	1	0	0	0	0	1
<i>fuscans</i>	SNES 22	France	<i>P. vulgaris</i> cv. Fin de bagnols	2010	1	1	0	0	0	0	1
<i>fuscans</i>	LSV 24	France	<i>P. vulgaris</i> cv. Suisse blanc	2005	1	1	0	0	0	0	1
<i>fuscans</i>	CFBP 6473	NA ^a	NA ^a	NA	0	0	1	1	1	1	1
1	CFBP 6546	USA	<i>P. vulgaris</i>	1978	0	0	0	0	1	1	1
1	CFBP 6935	Brazil	<i>P. vulgaris</i>	1993	0	0	0	0	1	1	1
1	CFBP 6936	Brazil	<i>P. vulgaris</i>	2000	0	0	0	0	1	1	1

Strains were chosen to represent various species and pathovars within *Xanthomonas*. Signal at the expected size for each primer set (1) indicates the presence of the marker, while the absence of PCR signal at the expected size (0) is interpreted as the absence of the gene or allelic diversity and a suspected absence of motility. Absence of motility was confirmed by soft-agar motility test as illustrated in Figure 7.

^a Not available.

flagellar cluster integrity and motility. These strains were sampled in the same field than *Xff* 4834-R (in 1998) and in fields representing the following bean generations (seeds harvested in 1998 field sown in 2000, and seeds harvested in 2000 field plots sown in 2002). About half of the strains isolated each year is mobile, while the other half is not (Table 6, Figure 7p to t). This suggests that two populations are cohabiting in these epidemics, one being flagellate and the other not. This suggests that a non-flagellate strain may be fit in the field, at least in mixed populations with flagellate strains, as it can naturally colonize beans and be seed-transmitted over several generations.

All the non-flagellate strains that lack *FliC* obviously also lack *Flg22*. *Flg22* is a major MAMP that is recognized by its cognate receptor *FLS2*, thus activating basic host defense responses. Since natural populations of *Xff* may be composed of flagellate and aflagellate strains, the size of the population is likely to be underestimated by the plant host due to the lack of recognition of aflagellate strains. Therefore, the *Xff* population may overcome host defense and more easily invade its host. However, non-functionality of the flagellar cluster is not a frequent

event in xanthomonads indicating that absence of motility could be a negative trait. Indeed, chemotaxis plays a major role in virulence of numerous pathogenic bacteria allowing bacteria to gain entry sites [148,149]. It is also likely that chemotaxis and motility play a role in fitness of bacteria outside the host, as in water for example. However, very little is known concerning any aspect of xanthomonads life outside their host. Without a functional flagellum, a bacterium cannot rely on chemotaxis to move toward attractants and away from repellants, and cannot locate and infect plant hosts in its natural niches, which could be considered as negative traits in natural environments.

***ISXfu2* is flanking the *hrp* gene cluster on both sides colocalizing with *T3E* gene insertions**

Breaks in synteny occur on both sides of the *hrp* cluster, in regions where various genes encoding candidate T3Es may be found. Interestingly, complete copies of *ISXfu2* are located on each side of the *hrp* cluster of *Xff* 4834-R. Such a location coincides with loci displaying variations between genomes of *Xanthomonas* (Figure 4; [46]). Indeed, on one side of the *hrp* cluster, the locus located

[illegible]

Table 5 Orthologs of Xcv 85–10 flagellar genes in genomes of xanthomonads (Continued)

XCV2029	flagellar basal body rod protein FlgF	1*	1	1	0	1	1*	1	1	1	1	1	1	1	0	0
XCV2030	flagellar hook protein FlgE	1*	1	1	0	1	1*	1	1	1	1	1	1	1	1	0
XCV2031	flagellar basal body rod modification protein	1*	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
XCV2032	flagellar basal body rod protein FlgC	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
XCV2033	flagellar basal-body rod protein FlgB	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
XCV2034	chemotaxis signal transduction protein	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
XCV2035	flagellar basal body P-ring biosynthesis protein FlgA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
XCV2036	negative regulator of flagellin synthesis	1*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
XCV2037	hypothetical protein XCV2037	1*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0

CDS are considered as orthologs (1) on the basis of an identity of more than 80% on more than 80% of the length of the CDS. CDS are considered as putative orthologs (1*) when homology is lower or on a shorter length of the CDS and if the expected functional domains are identified. On other cases, no orthologs are recorded (0).

^a X. translucens D61454.
^b X. translucens pv. translucens DSM 18974.
^c X. translucens pv. graminis ART-Xtg29.

Table 6 Patterns of flagellar clusters in *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains isolated from successive bean generations

Strain code	Year of bean cultivation	<i>fliM</i>	<i>fliE</i>	<i>fleQ</i>	<i>fliC</i>	<i>flgE</i>	<i>flgB</i>	<i>flgA</i>
CFBP 4885	1998	1	1	0	0	0	0	1
Xap57	1998	1	1	0	0	0	0	1
Xap59	1998	1	1	0	0	0	0	1
CFBP 4884	1998	1	1	1	1	1	1	1
Xap45	1998	1	1	1	1	1	1	1
Xap48	1998	1	1	1	1	1	1	1
Xap53	1998	1	1	1	1	1	1	1
Xap62	1998	1	1	1	1	1	1	1
Xap466	2000	1	1	0	0	0	0	1
Xap464	2000	1	1	1	1	1	1	1
Xap697	2002	1	1	0	0	0	0	1
Xap502	2002	1	1	1	1	1	1	1
Xap503	2002	1	1	1	1	1	1	1

Signal at the expected size for each primer set (1) indicates the presence of the marker, while the absence of PCR signal at the expected size (0) is interpreted as the absence of the gene or allelic diversity and a suspected absence of motility. Absence of motility was confirmed by soft-agar motility test as illustrated in Figure 7.

between *hpaB* and *hrpF* carries a copy of *ISXfu2* and T3E genes: *hpa3* and *xopF1*. Neither *ISXfu2* nor *xopF1* and *hpa3* are present in the genome of *Xac* 306. In *Xoo* Pxo99, the *ISXo8* is located at the same locus as *ISXfu2* in *Xff* 4834-R. In *Xoc* BLS256, this locus features a large insertion that carries carbohydrate degradation operons, virulence genes such as the T3E gene *xopAD*, *tat* genes, and transposases next to the tRNA-Arg. On the other side of the *hrp* cluster of *Xff* 4834-R, another copy of *ISXfu2* is located between *hrcC* and *xopA*. In *Xcv* 85–10, *IS1595* is located at the same locus, as well as *xopD* and two genes coding hypothetical proteins. These observations suggest that in xanthomonads genomes, loci flanking the *hrp* cluster on both sides are prone to the insertion of mobile genetic elements carrying virulence genes, especially T3Es and behave as PAIs [150].

Gene rearrangements and insertions associated with mobile genetic elements

Integrations and gene cassette arrays are well known in clinical organisms in which they carry antibiotic resistance genes [151]. Integrations were also described in many bacteria colonizing diverse environments including plants, in which they are supposed to contribute to niche adaptation. Identification of chromosomal integrations in *Xanthomonas* is based on the presence of a DNA integrase (*intI*) homolog, a plausible integrase-associated recombination site (*attI*), and a gene cassette array bounded by *attC* formerly called 59-base element sites. In *Xanthomonas*, integrase chromosomal insertion is located adjacent to the acid dehydratase gene, *ilvD* [152].

In contrast, the *ilvD* region in *Xff* 4834-R contains an IS hot spot (*ISXfu2*, *ISXfu1*, and *ISXax1*) and several genes having no orthologs in other *Xanthomonas* genomes. However, integrase remnants are present elsewhere in *Xff* 4834-R genome (Additional file 7). A truncated copy of *intI* is found 2.5 Mb away in *Xff* 4834-R genome, and adjacent to *intI*, the *attI* site flanked by an array of gene cassettes consisting of a single CDS and its *attC* site [152]. In *Xcc* ATCC33913 integron, several copies of *pigH* are present in the cassette array. One pseudogenized copy of *pigH* is also present in the cassette array of *Xff* 4834-R. The four other cassettes of this array contain genes encoding cryptic hypothetical proteins. Contiguous to this region, a spot of 4 ISs (*ISXax1*, *ISXcd1*, and two copies of *ISXfu2*) may be involved in the genomic reorganization of *ilvD* region explaining the different *Xff* 4834-R integron localizations in comparison to all other sequenced *Xanthomonas*. In these two regions, different genes with low GC% and showing no or partial similarities with genes in other *Xanthomonas* are found together with genes which phylogenies do not follow organism phylogeny (data not shown). This suggests that these genes may have been acquired by IS- and/or integrase-promoted HGT.

Most gene pseudogenizations result from indel leading to frameshift and stop codons

The availability of a deep sequenced and fully assembled genome for *Xff* 4834-R and of several genomes of closely related organisms gives the opportunity to question pseudogenization. Indeed, comparative genomics is a good mean to identify pseudogenes [153]. In *Xff* 4834-R genome, the 137 events of pseudogenization observed fall into four cases (Additional file 3). First, fragments of gene for which the mechanism of pseudogenization is not visible anymore could be detected. Fourteen gene fragments initially encoding various functions result from gene erosion by comparison with functional orthologs in other xanthomonads. Among them, *ψxopF2* seems to be a truncated and degenerated copy of *xopF2*, a T3E encoding gene located downstream. A truncated copy and a complete copy of *virB6* gene are also present in the genome of *Xff* 4834-R. Two truncated copies of *virB6* are also present in *Xac* 306 that both correspond to the N-terminal part of VirB6. Such a process of gene duplication is described to precede pseudogenization or novel function acquisition in various organisms [154]. Second, numerous pseudogenizations are due to CDS disruption by ISs. Fifteen *Xff* 4834-R pseudogenes belong to this category and most of them affect genes encoding hypothetical proteins, one element of the T4p, and one small remnant of a non-fimbrial adhesin encoding gene (*XFF4834R_chr19500*). For one of these pseudogenes, a preceding event of gene duplication seems to have

occurred, as this latter pseudogene is located downstream its putative functional copy *fhaB*_{XFF4834R_chr19450}, orthologous to *fhaB*_{XAC1815}. Third, a sense codon has acquired a point mutation turning it into a stop codon causing premature termination of translation. There are 27 *Xff* 4834-R pseudogenes concerned by this kind of in-frame stop. For 25 of them, a second peptide corresponding to the C-terminal part of the protein can be predicted. RNA sequencing or functional analyses would demonstrate if some of them are still functional and could correspond to the creation of novel genes by fission. Gene fission is already known in the case of modular proteins for which fragments containing functional domain fragments can still be considered as genes. This is the case for some TCRs [58]. Fourth, most putative pseudogenizations (81 among the 137) found in *Xff* 4834-R genome correspond to frameshifted genes consecutive to a short insertion or deletion in the sequence leading to heterologous C-terminal amino acids and/or premature termination of translation (Additional file 3).

A frameshift in *hmgA* could lead to fuscous pigment production in *Xff* 4834-R.

A case of pseudogenization by frameshift is particularly relevant in the case of *Xff* 4834-R, as it explains the abundantly described fuscous phenotype of *Xff*. Indeed, *Xff* produce a fuscous pigment due to the disruption of tyrosin catabolism. Secretion and subsequent oxidation of homogentisic acid confers this phenotype to *Xff* strains [19]. Tyrosine is catabolized as part of normal intermediary metabolism and in the breakdown of external proteins by microorganisms. In order to describe the genetic basis of this specificity of *Xff* strains compared to most other xanthomonads, we analyzed the tyrosine degradation pathway (<http://biocyc.org/META/new-image?object=TYRFUMCAT-PWY>). In tyrosine degradation I pathway, tyrosine is converted into fumarate through five reactions. It starts out with the transfer of its amino group to alpha-ketoglutarate by tyrosine-glutamate aminotransferase (EC 2.6.1.5). The degradation intermediate of this transaminase reaction is 4-hydroxy-phenylpyruvate, which in turn is oxidized in the presence of vitamin C to homogentisic acid. This reaction is catalyzed by 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27). The ring structure of homogentisate is subsequently broken and the linear C8 unit degraded in two reaction steps to fumarate and acetoacetate, one citric acid cycle intermediate and one ketone body. Based on high sequence similarity with homologs in other xanthomonads, genes of this pathway seem to be functional in the genome of *Xff* 4834-R, with the exception of *hmgA*, the gene encoding the homogentisate oxygenase. Interestingly, this gene *ψXFF4834R_chr04450* appears to be non-functional in *Xff* 4834-R, due to a

frameshift at position 920. Instead of a 458 residues reported for other HmgA, the protein synthesized by *Xff* 4834-R is 306 aa long. There are no functional orthologs of this gene in *Xff* 4834-R. Correction of this mutation or complementation of *Xff* 4834-R strain with a functional allele would definitely proof that in wild type *Xff* homogentisate could not be degraded in 4-maleyl-acetoacetate and accumulates giving rise to the brown diffusible pigment of *Xff*. Indeed, this acid can spontaneously oxidize and polymerize, leading to the formation of pyomelanins [155].

Except for pseudogenes related to HGT events, phylogeny of *Xff* 4834-R putative pseudogenes follows the phylogeny of the organisms.

In order to get insights into the pseudogene evolutionary history, we compared the phylogenetic tree of every gene family having a pseudogene in *Xff* 4834-R with the phylogeny of six housekeeping genes among the 15 genomes used for comparative genomics (Additional file 1). Two pseudogenes (*XFF4834R_chr25070* and *XFF4834R_chr25180*), located in the integron region (see above), have nucleotide sequences more closely related to *Xcc* ATCC33913 than to *Xfa* ICPB10535 or *Xac* 306 (Additional file 8). This is consistent with HGT and also with the deleterious impact of integrons on genomes [156]. Moreover, a third pseudogene (*XFF4834R_chr33800*) has a phylogeny different from that of the organisms. This pseudogene of unknown function is located in the vicinity of *ISXax1* and then could have been acquired by HGT. The phylogeny of the other pseudogenes follows the phylogeny of the housekeeping genes reflecting a probable recent pseudogenization (Additional file 8).

Conclusions

Genomic comparisons and *Xff* 4834-R genome annotation enlighten features involved in plant pathogenicity and adaptation to different ecological niches. We identified 29 T3Es, including TALEs, depolymerizing carbohydrate enzymes, sensors of TCRS and chemotaxis, T3DT and many proteins of unknown functions that could be involved in bean adaptation, colonization of xylem and other niches, the role of which remains to be explored. The distribution of these genes in large collections of strains representing the genetic diversity of bean bacterial blight pathogens and allele sequence comparison should reveal their evolutionary history and allow the selection of candidates for further functional analyses.

While *Xff* 4834-R is well adapted to survive in the phyllosphere and to colonize seeds notably through adhesion and biofilm aggregation [13,14,16] and is highly pathogenic on bean, genome sequence analysis reveals that this strain lacks a functional flagellum. Isolation of such variants from a natural epidemic reveals that either

Chromosomal rearrangements were explored using the progressive MAUVE algorithm as implemented in Mauve v2.3.1 [163].

Phylogeny of organisms used for genomic comparison

The complete nucleotide sequences of a set of six housekeeping genes (*atpD*, *dnaK*, *efp*, *glnA*, *gyrB*, *rpoD*) were extracted from the 15 genomes (Table 2). Whole amino acid sequences were aligned using ClustalW with a BLOSUM protein weight matrix and transposed back to nucleotide sequence level to gain a codon-based alignment. The alignments were manually edited with Bioedit Sequence Alignment Editor Software 7.0.9.0 [164]. Sequences were concatenated following the alphabetic order of the genes using Geneious 4.8.4. A phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood method (ML). The model of evolution for the ML analysis was determined using ModelTest 3.7 in Paup. Both hierarchical likelihood ratio test (hLRT) and the standard Akaike Information criterion (AICc) were used to evaluate the model scores. Phylogenetic tree and bootstraps values were obtained using PhyML 3.0 [165]. Bootstraps analyses were done with 1000 iterations. Trees were visualized and finalized with Mega 5.03 [166].

Pseudogenization study

Different kind of events are considered in this study: gene fragmentation detected by genomic comparison, insertion or deletion resulting in frameshift in coding regions modifying the length or the sequence of the predicted peptide, mutations resulting in an early stop codon, and insertion of IS. Degenerated transposase or phage genes are not taken into account in this study. Differences in the N-terminal part of the predicted protein (N-terminal truncated predicted peptides) are also not considered as prediction of start codons still remains to be confirmed by RNA sequencing. Frameshifts are detected with FrameD [159]. Frameshifts in the following CDSs have been confirmed by Sanger sequencing: XFF4834R_chr09400 (glucuronoxylanase), XFF4834R_chr36560 (methyl-accepting chemotaxis protein), XFF4834R_chr32500 (endo-1, 3-beta-glucanase), XFF4834R_chr32600 (xylosidase), XFF4834R_chr41020 (alpha-glucuronidase), XFF4834R_chr26090 (GumN), XFF4834R_chr19550 (adhesin-like hemagglutinin), XFF4834R_chr34200 (XagA), XFF4834R_chr12700 (PilQ), XFF4834R_chr36560 (methyl-accepting chemotaxis protein) and XFF4834R_chr41250 (endo-1,4-beta-xylanase). Primers were selected upstream and downstream of the frameshift in order to amplify a unique sequence in *Xff* 4834-R genome. Primers were validated by blast on *Xff* 4834-R genome with parameters for short queries with a minimum number of nucleotide matches of 15 nt and a maximum number of 5 mismatches. Primers were then checked *in silico* for specific and efficient gene amplifications (Amplify

software version 3.1.4). Primer description is available in Additional file 9. PCRs were performed as previously described [17] and amplicons were sequenced using Sanger technology (Genoscreen, France). Presence of CDSs that are putative pseudogenes in *Xff* 4834-R genome was assessed in the 15 genomes used in genomic comparisons by BLAST of the nucleic sequences (Additional file 3). When available, nucleic sequences of the corresponding genes were used to build a Neighbor-joining (Nj) tree using Phylip 3.69 that is further drawn with Njplot 2.3. Topology of each tree was compared with the phylogeny of the organisms as represented by the ML tree with the six housekeeping genes (see above). When pseudogene phylogeny was not congruent with the phylogeny of the organisms, genomic context of the pseudogene was analyzed further to get insight into the kind of event involved in the pseudogenization.

Design of PCR tests for analysis of flagellar cluster diversity

Consensus primer pairs were designed based on aligned flagellar clusters of *Xfa* ICPB 10535, *Xac* 306, *Xa* pv. *manihotis* CIO151, *Xcv* 85–10, *Xv* ATCC 35937, *X. campestris* pv. *vasculorum* NCPPB702, *Xcm* NCPPB4381, *Xcc* ATCC 33913, *Xoc* BLS256, *Xoo* KACC10331, and *Xal* GPE PC73). These primers aimed at amplifying seven genes, *fliM*, *fliE*, *fleQ*, *fliC*, *flgE*, *flgB*, and *flgA*, chosen as markers of the flagellar cluster integrity in a collection of more than 300 *Xanthomonas* strains. The list of these strains and their characteristics is available upon request. PCR assays were performed in 20- μ l volumes containing 200 μ M dNTP, 0.125 μ M each primer (Additional file 6), 4 μ l of GoTaq 5 X buffer, 0.4 U/ μ l of GoTaq polymerase, and 5 μ l of a boiled bacterial suspension (1×10^7 CFU/ml). PCR conditions were 3 min at 94°C; followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at annealing temperature specific of each primer pair, an elongation time adapted to amplicon size at 72°C; and ended with 10 min at 72°C. PCR amplifications were performed in duplicate for each strain.

Motility tests

Strain motility was tested in soft-agar assays. *Xanthomonas* strains were grown at 28°C up to 12 days in MOKA (yeast extract 4 g/l; casamino acids 8 g/l; KH_2PO_4 2 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/l) medium containing 0.2% agar and 0.05% tetrazolium chloride. A drop (10 μ l) of a 1×10^8 cfu/ml suspension is deposited in the middle of the plate and the radius of the colony measured every two days and imaged at five days.

Additional files

Additional file 1: Distribution of CDSs exclusively shared by *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R (*Xff* 4834-R) and only one of the 15 strains used in comparative genomics. The strains,

Xff 4834-R, *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* strain ICPB10535 (*Xfa* ICPB10535), *X. citri* pv. *citri* strain 306 (*Xac* 306), *X. axonopodis* subsp. *citrumelonis* strain F1 (*Xacm* F1), *X. euvesicatoria* strain 85-10 (*Xcv* 85-10), *X. campestris* pv. *musacearum* strain NCPPB4381 (*Xcm* NCPPB4381), *X. oryzae* pv. *oryzae* strain PXO99A (*Xoo* PXO99A), *X. oryzae* pv. *oryzicola* strain BLS256 (*Xoc* BLS256), *X. gardneri* strain ATCC19865 (*Xg* ATCC19865), *X. vesicatoria* strain ATCC35937 (*Xv* ATCC35937), *X. campestris* pv. *campestris* strain ATCC33913 (*Xcc* ATCC33913), *X. campestris* pv. *raphani* strain 756C (*Xcr* 756C), *Xylella fastidiosa* strain Temecula1 (*Xf* Temecula1), *Stenotrophomonas maltophilia* strain R551-3 (*Sm* R551-3), and *X. albilineans* strain GPE PC73 (*Xal* GPE PC73), are organized according to their phylogeny represented by the Maximum Likelihood phylogenetic tree based on six housekeeping gene sequences (*atpD*, *dnaK*, *efp*, *glnA*, *gyrB*, *rpoD*). Bold line indicates that bootstrap value (1000 replicates) is 100, if not, bootstrap value of the branch is indicated on the tree. Branch length for *Xf* Temecula1 is 0.6 substitution per site.

Additional file 2: List of the 240 unique CDSs of Xff 4834-R genome based on comparisons with the genomes of 12 other *Xanthomonas* spp. and two closely related organisms.

Additional file 3: List of putative pseudogenes and gene fragments in the genome of Xff 4834-R.

Additional file 4: Occurrences of PIP box motifs in the genome of Xff 4834-R.

Additional file 5: Insertion of extrachromosomal elements in Xff 4834-R genome and related enzymes.

Additional file 6: Primers for amplification of selected flagellum genes.

Additional file 7: Comparative maps of the integrin regions in Xcc ATCC33913 and Xff 4834-R. Are represented the integrase gene fragment *intI* (blue cassette), the integrin-associated recombination site (*attI*, shown as a diamond), the *pigH* gene fragment (yellow cassette), several hypothetical protein encoding genes (grey cassettes), 59-base elements (be) (small square) and several insertion sequences (red cassettes). The *attI* and 59-be sites are white filled if their recombination site does not conform to the consensus sequence 5-GTTRRRY. Colored cassettes indicate orthologs.

Additional file 8: Examples of phylogenetic trees (Neighbor-joining) obtained for gene families having a putative pseudogene in Xff 4834-R: (a) XFF4834R_chr05500 is a frameshifted gene for which two overlapping peptides could be predicted and phylogenetic tree has a topology similar to that of housekeeping genes, (b) XFF4834R_25070-25100 is disrupted by ISXax1 insertion (c) XFF4834R_chr25180 is a degenerated fragment of *pigH*, probably related to an integrin insertion acquired from Xcc and (d) XFF4834R_chr33800 is a frameshifted gene for which two peptides could still be predicted.

Additional file 9: Primers for verification of frameshifts of selected CDSs.

Abbreviations

ACUR: Alternative codon usage region; CDS: Protein-coding sequence; Hrp: Hypersensitive response and pathogenicity; IS: Insertion sequence; MLSA: Multilocus sequence analysis; rpf: Regulation of pathogenicity factors; T1SS to T6SS: Type I to Type VI secretion systems; T3SP: Type III secreted proteins; T3Es: Type III effectors; TCRS: Two component regulatory system; CWDE: Cell wall-degrading enzyme; TBDT: TonB-dependant transporter.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AD contributed to manual annotation of the genome and analysis of the data, and drafted parts of the manuscript. SC (Carrère) performed automatic annotation of the genome and OrthoMCL analysis. VB and SF performed sequencing of the genome. TB contributed to manual annotation of the genome and analysis of the data, and drafted part of the manuscript. RK contributed to manual annotation of the genome and analysis of the data. MLAO, SB, CB, SC (Cociancich), KD, LG, FG, EL, AM, LDN, EG, IP, SP, OP, IRS,

PR, MR, BS, MAVS, VW, CV and MA contributed to manual annotation of the genome and revised the manuscript. AI performed the flagellum distribution study. LSG performed OrthoMCL analysis and contributed to pseudogene analysis. CM conceived the study and revised the manuscript. MAJ conceived the study, contributed to manual annotation of the genome and analysis of the data, drafted parts of the manuscript, and coordinated the annotation project. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

AI is funded by a PhD grant from INRA-SPE and region Pays de la Loire, France. EG was funded by a PhD grant from the French Ministry of National Education and Research and French Guyana. SC, EG, MA, EL and LDN are funded by the LABEX TULIP (ANR-10-LABX-41), LSG is funded by ANR-2010-GENM-013 Xanthomix.

Author details

¹INRA, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49071, Beaucozè, France. ²AGROCAMPUS OUEST, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49045, Angers, France. ³Université d'Angers, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 QUASAV, PRES L'UNAM, F-49045, Angers, France. ⁴INRA, LIPM UMR 441, F-31326, Castanet-Tolosan, France. ⁵CNRS, LIPM UMR 2594, F-31326, Castanet-Tolosan, France. ⁶CEA, Genoscope, Centre National de Séquençage, F-91057, Evry Cedex, France. ⁷Universidad de Los Andes, Laboratorio de Micología y Fitopatología Uniandes, Bogotá, Colombia. ⁸CIRAD, UMR BGPI, F-34398, Montpellier Cedex 5, France. ⁹CIRAD, UMR PVBMT, F-97410, Saint-Pierre, La Réunion, France. ¹⁰Université de la Réunion, UMR PVBMT, F-97715, Saint-Denis, La Réunion, France. ¹¹IRD, UMR RPB, F-34394, Montpellier Cedex 5, France. ¹²GaTE Lab Botanica IBUSP 277 05508-900, São Paulo, SP, Brasil. ¹³Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, UMR LIPM, F-31326, Castanet-Tolosan Cedex, France. ¹⁴current address: Department of Biology, Center for Genomics and Systems Biology, New York University, 10003, New York, NY, USA. ¹⁵current address: ANSES, Laboratoire de Santé des végétaux, F-49044, Angers, France.

Received: 18 July 2013 Accepted: 26 October 2013

Published: 6 November 2013

References

- Hayward AC: The hosts of *Xanthomonas*. In *Xanthomonas*. Edited by Swings JG, Civerolo EL. London, United Kingdom: Chapman & Hall; 1993:1-119.
- Vauterin L, Rademaker J, Swings J: Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology* 2000, **90**:677-682.
- Vauterin L, Hoste B, Kersters K, Swings J: Reclassification of *Xanthomonas*. *Int J Syst Bacteriol* 1995, **45**:472-489.
- Dye DW, Bradbury JF, Goto M, Hayward AC, Lelliott RA, Schroth MN: International standards for naming pathovars of phytopathogenic and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev Plant Pathol* 1980, **59**:153-168.
- Broughton WJ, Hern G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J: Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant Soil* 2003, **252**:55-128.
- Vidaver AK: *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: cause of common bacterial blight of bean. In *Xanthomonas*. Edited by Swings JG, Civerolo EL. London, United Kingdom: Chapman & Hall; 1993:40-44.
- Graham PH, Vance CP: Update on legume utilization legumes: importance and constraints to greater Use. *Plant Physiol* 2003, **131**:872-877.
- Kaplan L, Lynch TF: *Phaseolus* (fabaceae) in archaeology: AMS. *Econ Bot* 1999, **53**:261-272.
- Gepts P: Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. *Hortscience* 1998, **33**:1124-1130.
- Singh SP, Munoz CG: Resistance to common bacterial blight among *phaseolus* species and common bean improvement. *Crop Sci* 1999, **39**:80-89.
- Miklas PN, Kelly JD, Beebe SE, Blair MW: Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. *Euphytica* 2006, **147**:105-131.
- Weller DM, Saettler AW: Colonization and distribution of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in field-grown navy beans. *Phytopathology* 1980, **70**:500-506.
- Jacques M, Josi K, Darrasse A, Samson R: *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* var. *Fuscans* Is aggregated in stable Biofilm population sizes in the phyllosphere of Field-grown beans. *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:2008-2015.

14. Darrasse A, Bureau C, Samson R, Morris C, Jacques M-A: Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *Eur J Plant Pathol* 2007, **119**:203–215.
15. Büttner D, Bonas U: Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* 2010, **34**:107–133.
16. Darsonval A, Darrasse A, Durand K, Bureau C, Cesbron S, Jacques M-A: Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *Mol Plant Microbe Interact* 2009, **22**:747–757.
17. Darsonval A, Darrasse A, Meyer D, Demarty M, Durand K, Bureau C, Manceau C, Jacques M-A: Type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in the phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible beans. *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:2669–2678.
18. Hajri A, Brin C, Hunault G, Lardeux F, Lemaire C, Manceau C, Boureau T, Poussier S: A « repertoire for repertoire » hypothesis : repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *xanthomonas*. *PLoS One* 2009, **4**(8):E6632.
19. Goodwin PH, Sopher CR: Water stress in leaves of *Phaseolus vulgaris* infected with *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *J Phytopathol* 1994, **140**:219–226.
20. Birch PRJ, Hyman LJ, Taylor R, Opio AF, Bragard C, Toth IK: RAPD PCR-based differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. *Eur J Plant Pathol* 1997, **103**:809–814.
21. Toth IK, Hyman LJ, Taylor R, Birch PRJ: PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in plant material and its differentiation from *X. c. pv. phaseoli*. *J Appl Microbiol* 1998, **85**:327–336.
22. Fourie D: Distribution and severity of bacterial diseases on Dry beans (*phaseolus vulgaris* L.) in south africa. *J Phytopathol* 2002, **150**:220–226.
23. Gilbertson RL, Otoy MM, Pastor-Corrales MA, Maxwell DP: Genetic diversity in common blight bacteria is revealed by cloned repetitive DNA sequences. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* 1991, **34**:37–38.
24. Mkandawire ABC, Mabagala RB, Guzman P, Gepts P, Gilbertson RL: Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen coevolution with the common bean. *Phytopathology* 2004, **94**:593–603.
25. Alavi SM, Sanjari S, Durand F, Brin C, Manceau C, Poussier S: Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiple suppression subtractive hybridizations. *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:3295–3301.
26. Mhedbi-hajri N, Hajri A, Boureau T, Darrasse A, Durand K, Brin C, Fischer-Le Saux M, Manceau C, Poussier S, Pruvost O, et al: Evolutionary history of the plant pathogenic bacterium *xanthomonas axonopodis*. *PLoS One* 2013, **8**:e58474.
27. Rademaker JLW, Louws FJ, Schultz MH, Rossbach U, Vauterin L, Swings J, de Bruijn FJ: A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology* 2005, **95**:1098–1111.
28. Bull CT, de Boer SH, Denny TP, Firrao G, Fischer-Le Sau M, Saddler G, Scortichini M, Stead DE, Takikawa Y: List of New names of plant pathogenic bacteria (2008–2010). *J Plant Pathol* 2012, **94**:21–27.
29. Burkholder WH: The bacterial diseases of bean: a comparative study. In *1930; Ithaca*. N. Y: Agric. Exp. Stn; 1930:88.
30. Ryan RP, Vorhölter F-J, Potnis N, Jones JB, van Sluys M-A, Bogdanove AJ, Dow JM: Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium – plant interactions. *Nat Rev Microbiol* 2011, **9**:344–355.
31. Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G: The *arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* 2006, **18**:465–476.
32. Oblessuc PR, Borges A, Chowdhury B, Caldas DGG, Tsai SM, Camargo LEA, Melotto M: Dissecting *Phaseolus vulgaris* innate immune system against *Colletotrichum lindemuthianum* infection. *PLoS One* 2012, **7**:e43161.
33. Saddler GS, Bradbury JF: Family I. *Xanthomonadaceae* fam. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed Vol 2 (The Proteobacteria), Part B (The Gammaproteobacteria)*. 2nd edition. Edited by Springer-Verlag. Berlin, Germany: Garrity, G; 2005:63.
34. Pieretti I, Royer M, Barbe V, Carrere S, Koebernik R, Cociancich S, Couloux A, Darrasse A, Gouzy J, Jacques M-A, et al: The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. *BMC Genomics* 2009, **10**:616.
35. Riley M: Functions of the gene products of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 1993, **57**:862–952.
36. Tettlin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli SV, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, et al: Genome analysis of multiple pathogenic isolates of streptococcus agalactiae: implications for the microbial “ pan-genome ”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:13950–13955.
37. Zhao Y, Wu J, Yang J, Sun S, Xiao J, Yu J: PGAP : pan-genomes analysis pipeline. *Bioinformatics* 2012, **28**:416–418.
38. Lu H, Patil P, Van Sluys M-A, White FF, Ryan RP, Dow JM, Rabinowicz P, Salzberg SL, Leach JE, Sonti R, et al: Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*. *PLoS One* 2008, **3**:e3828.
39. Bogdanove AJ, Koebernik R, Lu H, Furutani A, Angiuoli SV, Patil PB, Van Sluys M-A, Ryan RP, Meyer DF, Han S-W, et al: Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue specificity of plant pathogenic *Xanthomonas* spp. *J Bacteriol* 2011, **193**:5450–5464.
40. Young JM, Park DC, Shearman H, Fargier E: A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst Appl Microbiol* 2008, **31**:366–377.
41. Jalan N, Aritua V, Kumar D, Yu F, Jones JB, Graham JH, Setubal JC, Wang N: Comparative genomic analysis of *xanthomonas axonopodis* pv. *Citrusmelo* F1, which causes citrus bacterial spot disease, and related strains provides insights into virulence and host specificity. *J Bacteriol* 2011, **193**(22):6342–6357.
42. da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LMC, et al: Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 2002, **417**:459–463.
43. Studholme D, Kemen E, MacLean D, Schornack S, Aritua V, Thwaites R, Grant M, Smith J, Jones JD: Genome-wide sequencing data reveals virulence factors implicated in banana *Xanthomonas* wilt. *FEMS Microbiol Lett* 2010, **310**(2):182–192.
44. Thieme F, Koebernik R, Bekel T, Berger C, Boch J, Büttner D, Caldana C, Gaigalat L, Goesmann A, Kay S, et al: Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol* 2005, **187**(21):7254–7266.
45. Moreira LM, Almeida NF, Potnis N, Diquanpietri LA, Adi SS, Bortolossi JC, da Silva AM, de Moraes AM, de Oliveira JC, de Souza RF, et al: Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. *BMC Genomics* 2010, **11**:238.
46. Potnis N, Krasileva K, Chow V, Almeida NF, Patil PB, Ryan RP, Sharlach M, Behlau F, Dow JM, Momol MT, et al: Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. *BMC Genomics* 2011, **12**:146.
47. Salzberg SL, Sommer DD, Schatz MC, Phillippy AM, Rabinowicz PD, Tsuge S, Furutani A, Ochiai H, Delcher AL, Kelley D, et al: Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A. *BMC Genomics* 2008, **9**:204.
48. Van Sluys MA, de Oliveira MC, Monteiro-Vitorello CB, Miyaki CY, Furlan LR, Camargo LE, da Silva AC, Moon DH, Takita MA, Lemos EG, et al: Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *J Bacteriol* 2003, **185**(3):1018–1026.
49. Lukjancenko O, Ussery DW, Wassenaar TM: Comparative genomics of bifidobacterium, lactobacillus and related probiotic genera. *Microb Ecol* 2012, **63**:651–673.
50. Bannantine J, Wu C-W, Hsu C, Zhou S, Schwartz DC, Bayles DO, Paustian ML, Alt DP, Sreevatsan S, Kapur V, et al: Genome sequencing of ovine isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* offers insights into host association. *BMC Genomics* 2012, **13**:89.
51. Baltrus D, Nishimura MT, Romanchuk A, Chang JH, Mukhtar MS, Cherkis K, Roach J, Grant SR, Jones CD, Dangl JL: Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog* 2011, **7**:e1002132.
52. Meyer D, Bogdanove AJ: Genomics-driven advances in *Xanthomonas* biology. In *Plant Pathogenic Bacteria: Genomics and Molecular Biology*. Edited by Jackson R. Norfolk: Caister Academic Press; 2009:147–161.
53. Guieysse B, Wurtz S: Metabolically versatile large-genome prokaryotes. *Curr Opin Biotechnol* 2011, **23**:1–7.
54. Beattie GA, Lindow SE: The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu Rev Phytopathol* 1995, **33**:145–172.

55. Pieretti I, Royer M, Barbe V, Carrere S, Koebnik R, Couloux A, Darrasse A, Gouzy J, Jacques M-A, Lauber E, et al: Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. *BMC Genomics* 2012, **13**:658.
56. Galperin MY: Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* 2004, **6**:552-567.
57. Galperin MY: A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: Bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol* 2005, **5**:35.
58. Qian W, Han Z-J, He C: Two-component signal transduction systems of *xanthomonas* spp.: a lesson from genomics. *Mol Plante-Microbe Interact* 2008, **21**:151-161.
59. Galperin MY, Koonin EV: From complete genome sequence to 'complete' understanding? *Trends Biotechnol* 2010, **28**:398-406.
60. Kim D-J, Forst S: Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology* 2001, **147**:1197-1212.
61. Craig L, Li J: Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr Opin Struct Biol* 2008, **18**:267-277.
62. Burrows LL: *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu Rev Microbiol* 2012, **66**:493-520.
63. Korotkov KV, Sandkvist M, Hol WGJ: The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol* 2012, **10**:336-351.
64. Meng Y, Li Y, Galvani CD, Hao G, Turner JN, Burr TJ, Hoch HC: Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *J Bacteriol* 2005, **187**:5560-5567.
65. Lim SM, So B-H, Wang J, Song ES, Park Y-J, Lee B-M, Kang H-W: Functional analysis of *pilQ* gene in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, bacterial blight pathogen of rice. *J Microbiol* 2008, **46**:214-220.
66. Waksman G, Hultgren SJ: Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Micro* 2009, **7**:765-774.
67. Desvaux M, Hébraud M, Talon R, Henderson IR: Outer membrane translocation: numerical protein secretion nomenclature in question in mycobacteria. *Trends Microbiol* 2009, **17**:338-340.
68. Dautin N, Bernstein HD: Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* 2007, **61**:89-112.
69. Cotter SE, Surana NK, St Geme JW: Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol* 2005, **13**:199-205.
70. Linke D, Riess T, Autenrieth IB, Lupas A, Kempf VAJ: Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol* 2006, **14**:264-270.
71. Mazar J, Cotter PA: Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol Microbiol* 2006, **62**:641-654.
72. Mhedbi-Hajri N, Darrasse A, Pigné S, Durand K, Fouteau S, Barbe V, Manceau C, Lemaire C, Jacques M-A: Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant pathogenic xanthomonads. *BMC Evol Biol* 2011, **11**:67.
73. Sutherland IW: Xanthan. In *Xanthomonas*. Edited by Swings J-G, Civerolo EL. London: Chapman & hall; 1993:363-388.
74. García-Ochoa F, Santos VE, Casas JA, Gómez E: Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnol Adv* 2000, **18**:549-579.
75. Vu B, Russel JC, Ivanova EP: Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 2009, **14**:2535-2554.
76. El-Banoby FE, Rudolph KWE: Multiplication of *Xanthomonas campestris* pvs *secalis* and *translucens* in host and non-host plants (rye and barley) and development of water soaking. *EPPO Bull* 1989, **19**:105-111.
77. Vidhyasekaran P, Alvenda ME, Mew TW: Physiological changes in rice seedlings induced by extracellular polysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Physiol Mol Plant Pathol* 1989, **35**:391-402.
78. Dunger G, Relling VM, Tondo ML, Barreras M, Ielpi L, Orellano EG, Ottado J: Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Arch Microbiol* 2007, **188**:127-135.
79. Rigano LA, Siciliano F, Enrique R, Sendin L, Filippone P, Torres PS, Qüesta J, Dow JM, Castagnaro AP, Vojnov AA, et al: Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*. *Mol Plant Microbe Interact* 2007, **20**:1222-1230.
80. Vorhölter F-J, Schneider S, Goesmann A, Krause L, Bekel T, Kaiser O, Linke B, Patschkowski T, Rückert C, Schmid J, et al: The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J Biotech* 2008, **134**:33-45.
81. Yoon K-H, Cho J-Y: Transcriptional analysis of the *gum* gene cluster from *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*. *Biotechnol Lett* 2007, **29**:95-103.
82. Köplin R, Arnold W, Hotte B, Simon R, Wang GE, Pühler A: Genetics of xanthan production in *xanthomonas campestris*: the *xanA* and *xanB* genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. *J Bacteriol* 1992, **174**:191-199.
83. Tao F, Swarup S, L-h Z, Biology C: Quorum sensing modulation of a putative glycosyltransferase gene cluster essential for *Xanthomonas campestris* biofilm formation. *Environ Microbiol* 2010, **12**:3159-3170.
84. Wang X, Ili JFP, Romeo T: The *pgaABCD* locus of *escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Appl Microbiol* 2004, **186**:2724-2734.
85. Bobrov AG, Kirillina O, Forman S, Mack D, Perry RD: Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environ Microbiol* 2008, **10**:1419-1432.
86. Raetz CRH, Whitfield C: Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 2002, **71**:635-700.
87. Sperandio P, Dehò G, Polissi A: The lipopolysaccharide transport system of gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2009, **1791**:594-602.
88. Steinmann D, Köplin R, Pühler A, Niehaus K: *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* *lpsI* and *lpsJ* genes encoding putative proteins with sequence similarity to the α - and -subunits of 3-oxoacid CoA-transferases are involved in LPS biosynthesis. *Arch Microbiol* 1997, **168**:441-447.
89. Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE: Lipid a modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem* 2007, **76**:295-329.
90. Patil PB, Bogdanove AJ, Sonti RV: The role of horizontal transfer in the evolution of a highly variable lipopolysaccharide biosynthesis locus in xanthomonads that infect rice, citrus and crucifers. *BMC Evol Biol* 2007, **7**:243.
91. Perepelov AV, Li D, Liu B, Senchenkova SN, Guo D, Shevelev SD, Shashkov AS, Guo X, Feng L, Knirel YA, et al: Structural and genetic characterization of O99 antigen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009, **57**:80-87.
92. Neugebauer H, Herrmann C, Kammer W, Schwarz G, Nordheim A, Braun V: ExbBD-dependent transport of maltodextrins through the novel MalA protein across the outer membrane of *caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 2005, **187**:8300-8311.
93. Blanvillain S, Meyer D, Boulanger A, Lautier M, Guynet C, Denancé N, Vasse J, Lauber E, Arlat M: Plant carbohydrate scavenging through TonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS One* 2007, **2**(2):e224.
94. Eisenbeis S, Lohmiller S, Valdebenito M, Leicht S, Braun V: NagA-dependent uptake of N-acetyl-glucosamine and N-acetyl-chitin oligosaccharides across the outer membrane of *caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 2008, **190**:5230-5238.
95. Schauer K, Rodionov D, de Reuse H: New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'? *Trends Biochem Sci* 2008, **33**:330-338.
96. Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ, Buchanan SK: TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol* 2010, **64**:43-60.
97. Boulanger A, Déjean G, Lautier M, Glories M, Zischek C, Arlat M, Lauber E: Identification and regulation of the N-acetylglucosamine utilization pathway of the plant pathogenic bacterium *xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *J Bacteriol* 2010, **192**:1487-1497.
98. Déjean G, Blanvillain-Baufumé S, Boulanger A, Darrasse A, de Bernonville TD, Girard A-L, Carrère S, Jamet S, Zischek C, Lautier M, et al: he xylan utilization system of the plant pathogen *xanthomonas campestris* pv. *campestris* controls epiphytic life and reveals common features with oligotrophic bacteria and animal gut symbionts. *New Phytol* 2013.
99. Ryan RP, Dow JM: Intermolecular interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence-related signal transduction in *Xanthomonas campestris*. *Virulence* 2010, **1**:404-408.
100. Gudesblat GE, Torres PS, Vojnov AA: *Xanthomonas campestris* overcomes *Arabidopsis* stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiol* 2009, **149**:1017-1027.
101. Jenal U, Malone J: Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet* 2006, **40**:385-407.
102. Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Crossman LC, Spiro S, He Y-W, Zhang L-H, Heeb S, Cámara M, Williams P, et al: Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:6712-6717.

103. Tang JL, Liu YN, Barber CE, Dow JM, Wootton JC, Daniels MJ: **Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*.** *Mol Gen Genet* 1991, **226**:409–417.
104. Chatterjee S, Newman KL, Lindow SE: **Cell-to-cell signaling in *Xylella fastidiosa* suppresses movement and xylem vessel colonization in grape.** *Mol Plant-Microbe Interact* 2008, **21**:1309–1315.
105. Jeong KS, Lee SE, Han JW, Yang SU, Lee BM, Noh TH, Cha JS: **Virulence reduction and differing regulation of virulence genes in *rpf* mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.** *Plant Pathol J* 2008, **24**:143–151.
106. Poplawsky AR, Chun W: ***pigB* determines a diffusible factor needed for extracellular polysaccharide slime and xanthomonadin production in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.** *J Bacteriol* 1997, **179**:439–444.
107. He Y-W, Wu J, Zhou L, Yang F, He Y-Q, Jiang B-L, Bai L, Xu Y, Deng Z, Tang J-L, et al: ***Xanthomonas campestris* diffusible factor is 3-hydroxybenzoic acid and is associated with xanthomonadin biosynthesis, cell viability, antioxidant activity, and systemic invasion.** *Mol Plant Microbe Interact* 2011, **24**:948–957.
108. Poplawsky AR, Walters DM, Rouviere PE, Chun W: **A gene for a dioxygenase-like protein determines the production of the DF signal in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.** *Mol Plant Pathol* 2005, **6**:653–657.
109. Goel AK, Rajagopal N, Nagesh N, Sonti RV: **Genetic locus encoding functions involved in biosynthesis and outer membrane localization of xanthomonadin in *xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*.** *J Bacteriol* 2002, **184**:3539–3548.
110. Zhou L, Wang J-Y, Wang J, Poplawsky A, Lin S, Zhu B, Chang C, Zhou T, Zhang L-H, He Y-W: **The diffusible factor synthase XanB2 is a bifunctional chorismatase that links the shikimate pathway to ubiquinone and xanthomonadins biosynthetic pathways.** *Mol Microbiol* 2013, **87**:80–93.
111. Büttner D: **Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2012, **76**:262–310.
112. Delepelaire P: **Type I secretion in gram-negative bacteria.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**:149–161.
113. Masi M, Wandersman C: **Multiple signals direct the assembly and function of a type 1 secretion system.** *J Bacteriol* 2010, **192**:3861–3869.
114. Stavrinides J: **Origin and evolution of phytopathogenic bacteria.** In *Plant Pathogenic Bacteria: Genomics and Molecular Biology*. Edited by Jakson RW. Norfolk, UK: Caister Ac; 2009:330.
115. Moreira MAS, de Souza EC, de Moraes CA: **Multidrug efflux systems in gram-negative bacteria.** *Brazilian J Microbiol* 2004, **35**:19–28.
116. Burse A, Weingart H, Ullrich MS: **The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*.** *Mol Plant Microbe Interact* 2004, **17**:43–54.
117. Brown DG, Swanson JK, Allen C: **Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:2777–2786.
118. Palumbo JD, Kado CI, Phillips DA: **An isoflavonoid-inducible efflux pump in *agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots.** *J Bacteriol* 1998, **180**:3107–3113.
119. Poole K: **Bacterial Multidrug Efflux Pumps Serve Other Functions.** *Microbe* 2008, **3**:179–185.
120. Kuroda T, Tsuchiya T: **Multidrug efflux transporters in the MATE family.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1794**:763–768.
121. Papanikou E, Karamanou S, Economou A: **Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine.** *Nat Rev Microbiol* 2007, **5**:839–851.
122. Alvarez-Martinez CE, Christie PJ: **Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2009, **73**:775–808.
123. Fronzes R, Christie PJ, Waksman G: **The structural biology of type IV secretion systems.** *Nat Rev Micro* 2009, **7**:703–714.
124. Guglielmini J, de la Cruz F, Rocha EPC: **Evolution of conjugation and type IV secretion systems.** *Mol Biol Evol* 2012, **30**:315–331.
125. Alegria MC, Souza DP, Andrade MO, Docena C, Khater L, Ramos CHI, Ana C, Silva R, Farah CS, Silva ACR: **Identification of New protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*.** *J Bacteriol* 2005, **187**:2315–2325.
126. Souza DP, Andrade MO, Alvarez-Martinez CE, Arantes GM, Chuck S, Salinas RK: **A component of the *xanthomonadaceae* type IV secretion system combines a VirB7 motif with a N0 domain found in outer membrane transport proteins.** *PLoS Pathog* 2011, **7**:e1002031.
127. Juhas M, Crook DW, Dimopoulou ID, Lunter G, Harding RM, Ferguson DJP, Hood DW: **Novel type IV secretion system involved in propagation of genomic islands.** *J Bacteriol* 2007:761–771.
128. Silverman JM, Brunet YR, Cascales E, Mougous JD: **Structure and regulation of the type VI secretion system.** *Annu Rev Microbiol* 2012, **66**:453–472.
129. Szczesny R, Jordan M, Schramm C, Schulz S, Coge V, Bonas U, Büttner D: **Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.** *New Phytol* 2010, **187**:983–1002.
130. Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ: **Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition.** *Biochem J* 2004, **382**:769–781.
131. Stavrinides J, Ma W, Guttman DS: **Terminal reassortment drives the quantum evolution of type III effectors in bacterial pathogens.** *PLoS Pathog* 2006, **2**:e104.
132. Fenselau S, Bonas U: **Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems.** *Mol Plant Microbe Interact* 1995, **8**:845–854.
133. Cunac S, Boucher C, Genin S: **Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*.** *J Bacteriol* 2004, **186**:2309–2318.
134. Koebnik R, Krüger A, Thieme F, Urban A, Bonas U: **Specific binding of the *xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes.** *J Bacteriol* 2006, **188**:7652–7660.
135. Schmidtke C, Findeiss S, Sharma CM, Kuhfuss J, Hoffmann S, Vogel J, Stadler PF, Bonas U: **Genome-wide transcriptome analysis of the plant pathogen *Xanthomonas* identifies sRNAs with putative virulence functions.** *Nucl Acids Res* 2012, **40**:2020–2031.
136. Palmer GC, Jorth PA, Whiteley M: **The role of two *Pseudomonas aeruginosa* anthranilate synthases in tryptophan and quorum signal production.** *Microbiology* 2013, **159**:959–969.
137. Alavi SM, Poussier S, Manceau C: **Characterization of ISXax1, a novel insertion sequence restricted to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (variants fuscans and non-fuscans) and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:1678–1682.
138. Monteiro-Vitorello CB, de Oliveira MC, Zerillo MM, Varani AM, Civerolo E, van Sluys M-A: ***Xylella* and *Xanthomonas* Mobil'omics.** *OMICS* 2005, **9**:146–159.
139. Mahillon J, Chandler M: **Insertion sequences.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, **62**:725–774.
140. Shieh G-J, Lin C-H, Kuo J-L, Kuo T-T: **Characterization of an open reading frame involved in site-specific integration of filamentous phage Cf1t from *xanthomonas campestris* pv. *Citri*.** *Gene* 1995, **158**:73–76.
141. Qian W, Jia Y, Ren SX, He YQ, Feng JX, Lu LF, Sun Q, Ying G, Tang DJ, Tang H, et al: **Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.** *Genome Res* 2005, **15**:757–767.
142. El-Yacoubi B, Brunings AM, Yuan Q, Shankar S, Gabriel DW: **In planta horizontal transfer of a major pathogenicity effector gene.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:1612–1621.
143. Brunnings AM, Gabriel DW: ***Xanthomonas citri*: breaking the surface.** *Mol Plant Pathol* 2003, **4**:141–157.
144. Liu R, Ochman H: **Stepwise formation of the bacterial flagellar system.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:7116–7121.
145. Swings J, Vauterin L, Kersters K: **The bacterium *Xanthomonas*.** In *Xanthomonas*. Edited by Swings J, Civerolo E. London, United Kingdom: Chapman & Hall; 1993:121–156.
146. Ronald PC, Beutler B: **Plant and animal sensors of conserved microbial signatures.** *Science* 2010, **330**:1061–1064.
147. Macnab RM: **How bacteria assemble flagella.** *Annu Rev Microbiol* 2003, **57**:77–100.
148. Yao J, Allen C: **Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *ralstonia solanacearum*.** *J Bacteriol* 2006, **188**:3697–3708.
149. Dzincic SH, Luericio M, Ram JL: **Bacterial chemotaxis differences in *Escherichia coli* isolated from different hosts.** *Can J Plant Pathol* 2008, **54**:1043–1052.
150. Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U: **Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island.** *J Bacteriol* 2002, **184**:1340–1348.

151. Hocquet D, Llanes C, Thouverez M, Kulasekara HD, Bertrand X, Plésiat P, Mazel D, Miller SI: **Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting.** *PLoS Pathog* 2012, **8**:e1002778.
152. Gillings MR, Holley MP, Stokes HW, Holmes AJ: **Integrations in *Xanthomonas*: a source of species genome diversity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:4419–4424.
153. Kuo C-H, Ochman H: **The extinction dynamics of bacterial pseudogenes.** *PLoS Genet* 2010, **6**:e1001050.
154. Tutar Y: **Pseudogenes.** *Comp Funct Genomics* 2012, **2012**:6–9.
155. Carreira A, Ferreira LM, Loureiro V: **Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:3463–3468.
156. Nemergut DR, Robeson MS, Kysela RF, Martin AP, Schmidt SK, Knight R: **Insights and inferences about integron evolution from genomic data.** *BMC Genomics* 2008, **9**:261.
157. Aury J-M, Cruaud C, Barbe V, Rogier O, Mangenot S, Samson G, Poulain J, Anthouard V, Scarpelli C, Artiguenave F, et al: **High quality draft sequences for prokaryotic genomes using a mix of new sequencing technologies.** *BMC Genomics* 2008, **9**:603.
158. Thébaud P, Servant F, Schiex T, Gouzy J: **L'environnement iANT: integrated annotation tool.** In *JOBIM Conference Proceedings: 3-5 may 2000; Montpellier, France*. Montpellier: ENSA & LIRM; 2000:361–365.
159. Schiex T, Gouzy J, Moisan A, de Oliveira Y: **Framed: a flexible program for quality check and gene prediction in prokaryotic genomes and noisy matured eukaryotic sequences.** *Nucl Acids Res* 2003, **31**:3738–3741.
160. Gattiker A, Michoud K, Rivoire C, Auchincloss AH, Coudert E, Lima T, Kersey P, Pagni M, Sigrist CJA, Lachaise C, et al: **Automated annotation of microbial proteomes in SWISS-PROT.** *Comput Biol Chem* 2003, **27**:49–58.
161. Serres MH, Riley M: **MultiFun, a multifunctional classification scheme for *Escherichia coli* K-12 gene products.** *Microb Comp Genomics* 2000, **5**:205–222.
162. Li L, Stoeckert C, Roos DS: **OrthoMCL : identification of ortholog groups for eukaryotic genomes.** *Genome Res* 2003, **13**:2178–2189.
163. Darling AE, Mau B, Perna NT: **progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement.** *PLoS One* 2010, **5**:e11147.
164. Hall TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucleic Acids Symp Ser* 1999, **41**:95–98.
165. Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O: **New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0.** *Sys Biol* 2010, **59**:307–321.
166. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: **MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.** *Mol Biol Evol* 2011, **28**:2731–2739.

doi:10.1186/1471-2164-14-761

Cite this article as: Darrasse et al.: Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads. *BMC Genomics* 2013 **14**:761.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Draft Genome Sequence of the Flagellated *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* Strain CFBP 4884

A. Indiana,^{a,b,c} M. Briand,^{a,b,c} M. Arlat,^{d,e,f}  L. Gagnevin,^g  R. Koebnik,^h L. D. Noël,^{d,e} P. Portier,^{a,b,c} A. Darrasse,^{a,b,c} M. A. Jacques^{a,b,c}

INRA, Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS), UMR 1345 SFR 4207 QUASAV, Beaucauzé, France^a; Université d'Angers, Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS), UMR 1345 SFR 4207 QUASAV, Beaucauzé, France^b; Agrocampus Ouest, Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS), UMR 1345 SFR 4207 QUASAV, Beaucauzé, France^c; INRA, Laboratoire des Interactions Plantes Micro-Organismes (LIPM), UMR 441, Castanet-Tolosan, France^d; CNRS, LIPM, UMR 2594, Castanet-Tolosan, France^e; Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France^f; UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT), CIRAD, Saint-Pierre, La Réunion, France^g; UMR 186 IRD-Cirad-Université Montpellier 2 "Résistance des Plantes aux Bioagresseurs," Montpellier, France^h

A.I. and M.B. contributed equally to this study.

We report the draft genome sequence of the flagellated strain CFBP 4884 of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, which was isolated in an outbreak of common bacterial blight of beans along with non-flagellated strains. Comparative genomics will allow one to decipher the genomic diversity of strains cohabiting in epidemics.

Received 21 August 2014 Accepted 26 August 2014 Published 25 September 2014

Citation Indiana A, Briand M, Arlat M, Gagnevin L, Koebnik R, Noël LD, Portier P, Darrasse A, Jacques MA. 2014. Draft genome sequence of the flagellated *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain CFBP 4884. *Genome Announc*. 2(5):e00966-14. doi:10.1128/genomeA.00966-14.

Copyright © 2014 Indiana et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Address correspondence to Marie-Agnès Jacques, marie-agnes.jacques@angers.inra.fr.

Xanthomonas fuscans subsp. *fuscans* is one of the causal agents of the common bacterial blight of beans (*Phaseolus vulgaris*) (1). This disease is distributed worldwide where beans are cultivated, except in arid tropical regions (2). Bacterial blight of beans is the most devastating bacterial disease of beans (3) which can cause a 40% yield loss (2). Seed contamination impacts both bean production and the seed industry worldwide through direct and indirect costs.

Xanthomonas spp. are γ -proteobacteria motile by a single polar flagellum (4). Motility is an important feature involved in plant colonization and is often considered to be a pathogenicity factor. However, the only genome sequence available of *X. fuscans* subsp. *fuscans* was obtained from a non-flagellated strain (5). In this strain, a mobile element, ISXfu2, is associated with a deletion of 33 kb in the flagellar gene cluster, thus affecting the biosynthesis of the flagellum and motility. However, motility was identified in 95% of the tested *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains. Some of the motile strains of *X. fuscans* subsp. *fuscans* were isolated from the same epidemic and the same field as the non-flagellated strain CFBP 4834 (5). Hence, to better understand if the absence of flagellation is linked to a recent genetic event in a genetically homogeneous population or, in contrast, to the cohabitation of strains having diverged in the past, we sequenced the genome of the flagellated strain CFBP 4884 of *X. fuscans* subsp. *fuscans*, which was isolated along with strain CFBP 4834 from a bean leaf in 1998 in a heavily infected bean field in Beaucauzé, France (6). This strain is highly aggressive on beans.

The genome was sequenced using the Illumina Hi-Seq2500 platform (Genoscreen, France). The shotgun sequencing yielded 5,954,190 read pairs (100-bp paired-end reads with insert size of 1200 bp). A combination of Velvet (7), SOAPdenovo, and SOAPdenovo2 (8) yielded 203 contigs larger than 200 bp (N_{50} = 79,889 bp) with the largest contig of 319,482 bp for a total

assembly size of 5,003,118 bp. Genomic contigs were annotated using the EugeneP annotation pipeline to identify RNAs and protein-coding genes (9).

The genome of the strain CFBP 4884 has a gene content similar to other xanthomonads, and is most similar to the genome of the strain 4834-R (5). The exceptions are a set of 31 genes of the flagellar gene cluster, which are absent in the strain 4834-R and present in the CFBP 4884 genome. Fifteen other genes, coding hypothetical proteins and adhesins, are divergent between these two genome sequences. This resource will be valuable to investigate the mechanisms leading to the emergence of non-flagellated strains and to dissect the genomic diversity of strains of a quarantine pathogen.

Nucleotide sequence accession numbers. This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession no. [JPHG000000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/JPHG000000000/). The version described in this paper is the first version, JPHG01000000.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR-2010-GENM-013).

We thank Jérôme Gouzy, LIPM, Toulouse, France for the assembling of the genome sequence.

REFERENCES

1. Zaumeyer WJ. 1930. The bacterial blight of beans caused by *Bacterium phaseoli*. USDA Tech. Bull. 186:36.
2. Vidaver AK. 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: cause of common bacterial blight of bean, p 40–44. In Swings JG, Civerolo EL (ed), *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
3. Broughton WJ, Hern G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. *Plant Soil* 252:55–128. [http://dx.doi.org/10.1023/A:1024146710611](https://doi.org/10.1023/A:1024146710611).
4. Swings J, Vauterin L, Kersters K. 1993. The bacterium *Xanthomonas*, p

- 121–156. In Swings JG, Civerolo EL (ed), *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
5. Darrasse A, Carrère S, Barbe V, Boureau T, Arrieta-Ortiz ML, Bonneau S, Briand M, Brin C, Cociancich S, Durand K, Fouteau S, Gagnevin L, Guérin F, Guy E, Indiana A, Koebnik R, Lauber E, Munoz A, Noël LD, Pieretti I, Poussier S, Pruvost O, Robène-Soustrade I, Rott P, Royer M, Serres-Gardi L, Szurek B, Van Sluys M-A, Verdier V, Vernière C, Arlat M, Manceau C, Jacques M-A. 2013. Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads. *BMC Genomics* 14:761. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-761>.
6. Jacques M-A, Josi K, Darrasse A, Samson R. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2008–2015. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.4.2008-2015.2005>.
7. Zerbino DR, Birney E. 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18:821–829. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.074492.107>.
8. Luo R, Liu B, Xie Y, Li Z, Huang W, Yuan J, He G, Chen Y, Pan Q, Liu Y, Tang J, Wu G, Zhang H, Shi Y, Liu Y, Yu C, Wang B, Lu Y, Han C, Cheung DW, Yiu S-M, Peng S, Xiaoqian Z, Liu G, Liao X, Li Y, Yang H, Wang J, Lam T-W, Wang J. 2012. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *Gigascience*. 1:18. <http://dx.doi.org/10.1186/2047-217X-1-18>.
9. Sallet E, Roux B, Sauviac L, Jardinaud MF, Carrere S, Faraut T, de Carvalho-Niebel F, Gouzy J, Gamas P, Capela D, Bruand C, Schiex T. 2013. Next-generation annotation of prokaryotic genomes with EuGene-P: application to *Sinorhizobium meliloti* 2011. *DNA Res.* 20:339–354. <http://dx.doi.org/10.1093/dnares/dst014>.

Tableau 4.I : Liste des gènes différant entre les séquences génomiques de *Xff* souches 4834-R (Darrasse *et al.*, 2013) et CFBP 4884 (annotation v2 du 21/08/2014) par blasts réciproques (blastn).

Requête					Cible		
Locus tag	Taille (pb)	% longueur	% identité	Produit ¹	Locus tag	Taille (pb)	Produit
<i>XFF4834R_plb00130</i>	891	100	98	putative resolvase	/ ²		
<i>XFF4834R_plb00140</i>	969	100	99	putative resolvase	/		
<i>XFF4834R_plb00110</i>	525	84	100	Hypothetical protein	/		
<i>XFF4834R_plc00460</i>	348	96	100	Conserved hypothetical protein	/		
<i>XFF4834R_chr41690</i>	447	88	100	hypothetical protein	<i>XFFCFBP4884_038600</i>	423	hypothetical protein
<i>XFF4834R_chr25040</i>	828	45	100	Xcd1 transposase peptide 2	/		
<i>XFFCFBP4884_038160</i>	10776	99	100	filamentous haemagglutinin-like adhesin protein FhaB	<i>XFF4834R_chr19450</i>	13473	adhesin protein FhaB
<i>XFFCFBP4884_002070</i>	1398	97	100	putative molecular chaperone, ATPase component of HslUV			putative molecular chaperone, ATPase component of HslUV
<i>XFFCFBP4884_012570</i>	2670	92	100	protease	<i>XFF4834R_chr06470</i>	1368	protease
				adhesin XadA	<i>XFF4834R_chr34420</i>	3198	adhesin XadA
<i>XFFCFBP4884_022630</i>	321	74	100	putative glutaredoxin-related protein	<i>XFF4834R_chr26720</i>	273	putative glutaredoxin-related protein
<i>XFFCFBP4884_030900</i>	930	96	100	hypothetical protein	<i>XFF4834R_chr00680</i>	987	hypothetical protein
<i>XFFCFBP4884_041770</i>	1200	3	85	<i>fliC</i>	<i>XFF4834R_chr00080</i>	669	TonB protein
<i>XFFCFBP4884_041780</i>	1326	3	89	<i>fliD</i>	<i>XFF4834R_chr00350</i>	4473	glutamate synthase, large subunit
<i>XFFCFBP4884_041790</i>	414	8	84	<i>fliS</i>	<i>XFF4834R_chr29020</i>	744	Putative secreted protein
<i>XFFCFBP4884_041800</i>	294	18	71	XCV2019	<i>XFF4834R_chr18240</i>	1266	putative cation:proton antiporter
<i>XFFCFBP4884_041810</i>	567	8	86	XCV2018	<i>XFF4834R_chr02270</i>	1260	putative Na ⁺ /H ⁺ -exchanging protein
<i>XFFCFBP4884_041820</i>	633	55	57	XCV2017			DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with NarQ or NarX
<i>XFFCFBP4884_041830</i>	1404	31	63	<i>rpoN1</i>	<i>XFF4834R_chr33110</i>	642	RNA polymerase, sigma 54 (sigma N)
					<i>XFF4834R_chr16670</i>	1398	factor

XFFCFBP4884_041840	384	49	59	XCV2015	XFF4834R_chr33110	642	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with NarX or NarX
XFFCFBP4884_041850	1485	42	66	<i>fleQ</i>	XFF4834R_chr01760	1428	probable fused DNA-binding response regulator in two-component regulatory system
XFFCFBP4884_041860	1110	2	92	XCV2013	XFF4834R_chr18630	3921	conserved hypothetical protein
XFFCFBP4884_041870	222	11	88	XCV2012	XFF4834R_chr21090	2358	cell division protein FtsK
XFFCFBP4884_041880	987	9	61	<i>fabH</i>	XFF4834R_chr11170	978	probable 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III
XFFCFBP4884_041890	765	13	64	XCV2010	XFF4834R_chr00840	756	probable 2-deoxy-D-gluconate 3-dehydrogenase
XFFCFBP4884_041900	735	4	88	XCV2009	XFF4834R_chr10750	1050	Probable lipopolysaccharide core biosynthesis glycosyl transferase
XFFCFBP4884_041910	654	15	65	XCV2008	XFF4834R_chr40190	582	maltose O-acetyltransferase
XFFCFBP4884_041920	1146	2	89	XCV2007	XFF4834R_chr05450	2826	probable glutamate-ammonia-ligase
XFFCFBP4884_041930	624	6	79	XCV2006	XFF4834R_chr11700	1071	adenyllyltransferase
XFFCFBP4884_041940	1524	3	73	XCV2005	XFF4834R_chr28710	858	Putative oxydoeductase
XFFCFBP4884_042580	1206	4	77	<i>flgL</i>	XFF4834R_chr00320	1059	probable N-formylglutamate amidohydrolase HutG
XFFCFBP4884_042590	1875	2	90	<i>flgK</i>	XFF4834R_chr01730	339	putative Zinc-containing alcohol dehydrogenase superfamily protein
XFFCFBP4884_042600	1179	7	68	<i>flgJ</i>	XFF4834R_chr26840	1512	glnB nitrogen regulatory protein P-II transcription elongation factor NusA
XFFCFBP4884_042610	1119	5	75	<i>flgI</i>	XFF4834R_chr20420	2259	putative methyl-accepting chemotaxis protein
XFFCFBP4884_042620	693	5	87	<i>flgH</i>	XFF4834R_chr11600	1074	chemotaxis protein
XFFCFBP4884_042630	786	7	75	<i>flgG</i>	XFF4834R_chr14340	2586	sucrose regulon transcriptional repressor, lacI family
XFFCFBP4884_042640	756	9	69	<i>flgF</i>	XFF4834R_chr40890	900	probable protein disaggregation chaperone, ATP-dependent Clp protease subunit
							conserved hypothetical protein

XFFCFBP4884_042650	1224	3	90	<i>flgE</i>		XFF4834R_chr33540	2298	putative xanthine dehydrogenase, molybdenum-binding subunit
XFFCFBP4884_042660	666	10	69	<i>flgD</i>		XFF4834R_chr33950	483	putative peroxiredoxin
XFFCFBP4884_042670	408	13	72	<i>flgC</i>		XFF4834R_chr24160	1878	DNA mismatch repair protein
XFFCFBP4884_042680	402	11	74	<i>flgB</i>		XFF4834R_chr12760	1749	conserved hypothetical protein
XFFCFBP4884_042690	945	12	65	XCV2034		XFF4834R_chr20520	1275	chemotaxis signal transduction protein CheW
XFFCFBP4884_043790	321	77	100	hypothetical protein		XFF4834R_pla00480	345	hypothetical protein

¹ Nom de l’orthologue chez *X. euvesicatoria* 85-10 lorsque le gène est absent du génome de *Xff* 4834-R.

² Pas de cible identifiée, cf. tableau 2 pour plus de détails.

4. Résultats complémentaires

4.1. Matériels et méthodes

Génomique comparée

Des blasts réciproques des CDS (Coding DNA Sequence) sur les séquences nucléiques ont été réalisés entre les séquences des génomes de *Xff* souches 4834-R et CFBP 4884. Les différences entre les séquences des deux génomes ont été recherchées en trouvant les séquences des locus tag dont les pourcentages de longueur (%L) et d'identité (%I) étaient inférieurs à 100 %. La séquence du génome de 4834-R étant assemblée et de meilleure qualité (un chromosome et trois plasmides) que celle du génome de CFBP 4884 (203 contigs), les différences observées par les blasts des CDS de CFBP 4884 sur les séquences nucléiques de 4834-R sont considérées comme étant de vraies différences. Par contre, pour les différences observées avec les blasts des CDS de 4834-R sur les séquences nucléiques de CFBP 4884 une vérification supplémentaire a été réalisée. Dans ce cas, les séquences des locus tag dont le %L et %I étaient inférieurs à 100 % ont été localisées sur les séquences des contigs de CFBP 4884.

4.2. Résultats

Depuis la version publiée de la séquence génomique de CFBP 4884 (Indiana *et al.*, 2014), une nouvelle annotation a été faite grâce au pipeline EugenePP (Prokaryote Pipeline) (Sallet *et al.*, 2014) en utilisant 4834-R comme base d'entraînement (S. Carrère, 21/08/2014, LIPM, Toulouse). Cette dernière annotation est de meilleure qualité que la précédente. C'est donc cette nouvelle version (v2) qui est utilisée pour la comparaison avec la séquence de 4834-R. Les CDS qui diffèrent entre les génomes de 4834-R (Darrasse *et al.*, 2013) et de CFBP 4884-v2 sont au nombre de 42 (tableau 4.I). Comme attendu, la majorité des différences (30 gènes) concerne le cluster flagellaire. Parmi ces 30 gènes de CFBP 4884, 18 et 12 gènes composent respectivement 2 contigs entiers : les contigs 67 et 73. Ces deux contigs sont bordés chacun par les répétitions inversées gauche (IRL pour « Inverted Repeat Left ») pour le contig 67 et droite (IRR pour « Inverted Repeat Right ») pour le contig 73 de l'*ISXfu2* ? C'est cette séquence d'insertion qui a été identifiée à la place des gènes manquants du cluster flagellaire dans le

Tableau 4.II : Caractéristiques de 12 différences observées entre les séquences de *Xff* souches 4834-R (Darrasse *et al.*, 2013) et CFBP 4884 (annotation v2 du 21/08/2014).

Cas	Requête		Cible		différences entre requête et cible	
	Locus tag	Taille (pb)	% longueur	% identité	Locus tag	Taille (pb)
1	<i>XFF4834R_plb00130</i>	891	100	98	<i>Pas de cible identifiée dans la séquence de CFBP 4884</i>	La cible est partiellement présente à l'extrémité du contig 166
2	<i>XFF4834R_plb00140</i>	969	100	99	<i>Pas de cible identifiée dans la séquence de CFBP 4884</i>	La cible est partiellement présente à l'extrémité du contig 165
3	<i>XFF4834R_plb00110</i>	525	84	100	<i>Pas de cible identifiée dans la séquence de CFBP 4884</i>	La cible est partiellement présente à l'extrémité des contigs 122 et 162
4	<i>XFF4834R_plc00460</i>	348	96	100	<i>Pas de cible identifiée dans la séquence de CFBP 4884</i>	La cible est partiellement présente à l'extrémité du contig 157
5	<i>XFF4834R_chr41690</i>	447	88	100	<i>XFFCFBP4884_038600</i>	24 bases en plus chez 4834-R
6	<i>XFF4834R_chr25040</i>	828	45	100	<i>Pas de cible identifiée dans la séquence de CFBP 4884</i>	Une insertion/délétion unique de 24 bases
7	<i>XFFCFBP4884_038160</i>	10776	99	100	<i>XFF4834R_chr19450</i>	La cible est partiellement présente à l'extrémité du contig 149
8	<i>XFFCFBP4884_002070</i>	1398	97	100	<i>XFF4834R_chr06470</i>	Chez CFBP 4884, une délétion de 92 bases à partir de la position 10624, entraînant un changement de phase et un stop précoce
9	<i>XFFCFBP4884_012570</i>	2670	92	100	<i>XFF4834R_chr34420</i>	Mauvaise qualité de séquence en fin de gène
10	<i>XFFCFBP4884_022630</i>	321	74	100	<i>XFF4834R_chr26720</i>	Chez CFBP 4884, une délétion de 322 bases à partir de la position 2448, entraînant un changement de phase et un stop précoce
11	<i>XFFCFBP4884_030900</i>	930	96	100	<i>XFF4834R_chr00680</i>	Une insertion/délétion unique de 48 bases
12	<i>XFFCFBP4884_043790</i>	321	77	100	<i>XFF4834R_pla00480</i>	Mauvaise qualité de séquence en début de gène

génomique de 4834-R (figure 4.1). Dans le génome de CFBP 4884, les contigs 48 et 5 encadrent les contigs 67 et 73. À l'extrémité de ces contigs, il y a des IRR et IRL (figure 4.1C). Ces IRR et IRL reflètent sans doute la présence de copies entières de l'*ISXfu2* dont la transposase n'a pas été correctement séquencée et/ou a généré des difficultés lors de l'assemblage de ce génome.

En plus de ces 30 gènes, 12 autres gènes diffèrent entre les séquences génomiques de CFBP 4884 et 4834-R. Parmi ces gènes, deux codent des résolvas, un code une transposase, deux codent les adhésines XadA et FhaB, un code une ATPase composant de HslUV, un code une protéine d'oxydo-réduction interagissant avec le glutathion « putative glutaredoxin-related protein », et cinq gènes codent des protéines hypothétiques (tableau 4.I). Les différences proviennent sans doute dans la majorité des cas de problèmes de séquençage et/ou d'assemblage car concernent des gènes modulaires avec des éléments répétés dont cinq sont situés en extrémité de contig dans la séquence de CFBP 4884 (tableau 4.II, cas 1-4 et 6). Ces cinq séquences étant localisées en bord de contig chez CFBP 4884, elles ne sont pas considérées comme de vraies différences. Dans deux cas (tableau 4.II, cas 5 et 10) des insertions/délétions d'un nombre de nucléotides multiple de trois et ne modifiant donc pas le cadre de lecture sont identifiées entre les séquences de 4834-R et de CFBP 4884. Un de ces gènes (*XFF4834R_chr41690*) possède des motifs répétés qui pourraient avoir occasionné des erreurs d'assemblage et ne pas correspondre à une réelle différence entre les souches. Dans deux autres cas (Tableau 4.II, cas 7 et 9), l'insertion/délétion ne correspondant pas un nombre de nucléotides multiple de trois, il devrait y avoir frameshift dans la souche présentant l'insertion. Or aucun frameshift n'avait été identifié dans la séquence de 4834-R à ces positions. Il doit donc s'agir de délétions ou d'erreurs de séquençage du génome de CFBP 4884. Cela est d'autant plus vraisemblable qu'il s'agit de deux gènes (*XFF4834R_chr19450* et *XFF4834R_chr34420*) codant respectivement les adhésines FhaB et XadA. Ces gènes contiennent de nombreux motifs répétés sources d'erreurs d'assemblage et les gènes sont très longs. Enfin, dans deux cas (tableau 4.II, cas 11 et 12), nous observons une mauvaise qualité de séquence entraînant un problème de prédiction du start qui conduit à des différences de longueur de séquence et dans le cas 8, il s'agit peut-être d'un problème de séquence au niveau du codon stop.

4.3. Discussion

Comme attendu, l'îlot génomique dédié au système flagellaire de CFBP 4884 est complet (Indiana *et al.*, 2014). Comparé à l'îlot génomique correspondant chez 4834-R, il y a

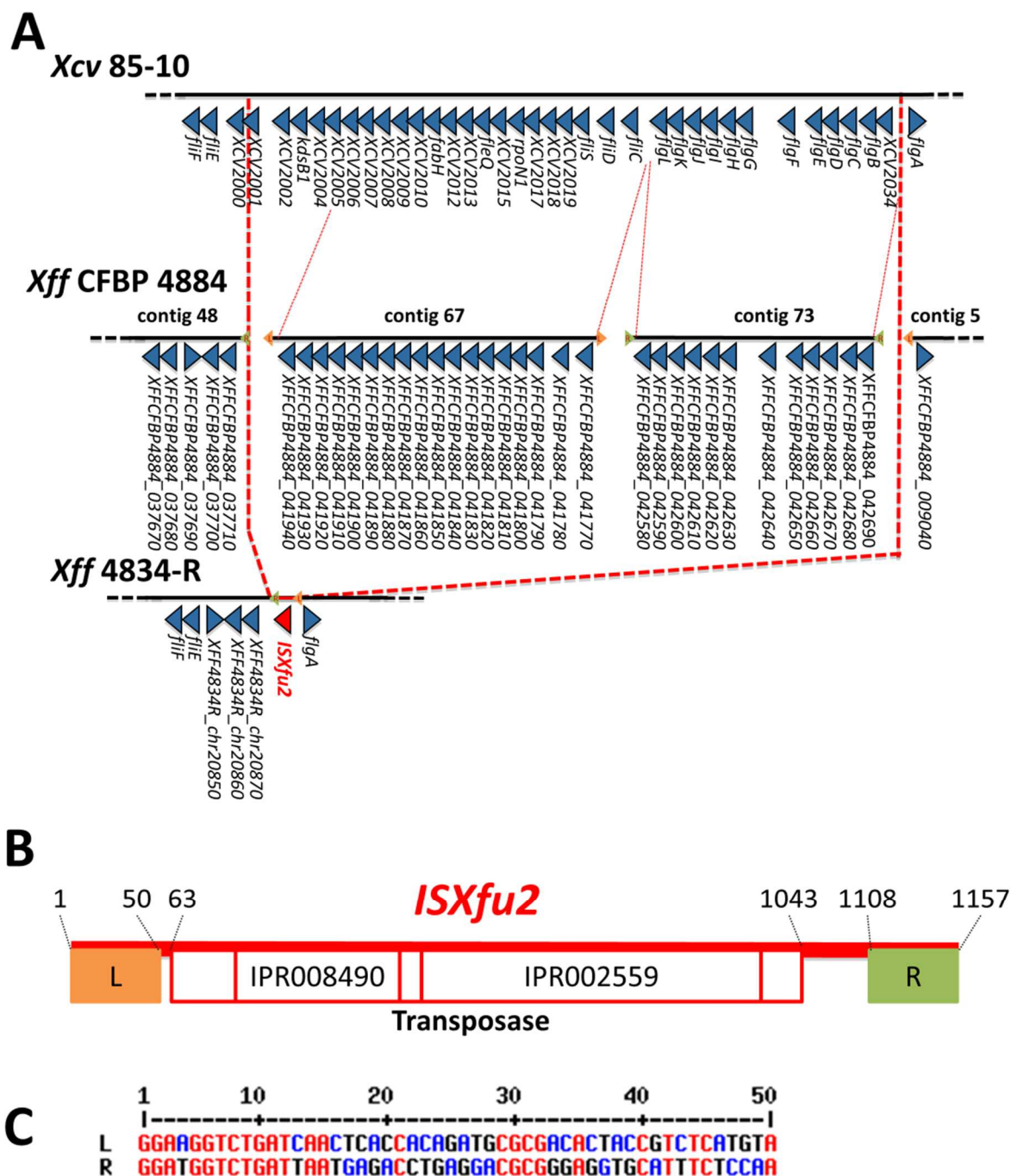


Figure 4.1. Représentation des clusters flagellaires identifiés chez *Xff* souches 4834-R et CFBP 4884 et *X. euvesicatoria* 85-10. (A) Représentation schématique de *ISXfu2*. Les chiffres représentent les positions des nucléotides sur la séquence de l'*ISXfu2*. Abréviations : Left Inverted Repeat Sequence (L), Right Inverted Repeat Sequence (R), Transposase InsH N-terminal (IPR008490), Transposase IS4-like (IPR002559). (B) Alignement de L et de R. (C) Synténie entre les îlots de gènes codant des protéines dédiées au système flagellaire. Les fragments de l'*ISXfu2* retrouvés sur les contigs 48, 67, 73 et 5 sont représentés par L (orange) et R (vert). Abréviations : *Xanthomonas euvesicatoria* (*Xcv* 85-10), *X. fuscans* subsp. *fuscans* (*Xff* CFBP 4884) et de *X. fuscans* subsp. *fuscans* (*Xff* 4834-R).

30 gènes supplémentaires chez CFBP 4884 répartis dans les contigs 67 et 73. Les contigs 67 et 73 n'ont probablement pas été assemblés entre eux et avec d'autres contigs en raison de la présence de copies de l'*ISXfu2*. Les contigs 67 et 73 peuvent être assemblés car ils sont bordés chacun par un IRL et un IRR qui correspondraient à la copie complète de l'*ISXfu2* entre ces deux contigs. Cette copie serait sur le brin +. Ce contig 67-73 est lui-même bordé de deux IRL et IRR correspondant chacun à l'extrémité d'une copie d'*ISXfu2* sur le brin -. Ces deux contigs s'assemblent certainement avec les contigs 48 et 5 pour former le contig 48-67-73-5, si l'on suppose l'existence de deux copies entières de l'*ISXfu2*, sur le brin -. Il est donc très vraisemblable qu'une recombinaison homologue entre ces deux ou trois copies d'*ISXfu2* ait conduit à l'excision d'une grande partie du cluster flagellaire (les contig 67-73) laissant une copie complète de l'*ISXfu2* dans le génome de la souche 4834-R à cet endroit.

Les 12 autres différences observées entre les séquences génomiques des deux souches semblent majoritairement consécutives à des problèmes techniques de séquençage et/ou d'assemblage du génome de 4834-R. Deux évènements d'insertions différencieraient les séquences de CFBP 4884 de celle de 4834-R.

Les différences entre les séquences de 4834-R et CFBP 4884 sont très peu nombreuses, hormis la délétion d'une grande partie du cluster flagellaire dans 4834-R. Ces deux souches ont été isolées du même échantillon végétal et représentent apparemment les deux populations de souches de *Xff* coexistant dans ce lot de semences de haricot. Il est donc très vraisemblable que l'émergence des souches non flagellées telles que 4834-R soit liée à l'activité probablement récente de cette *ISXfu2* dans une souche initialement flagellée sans doute très proche de CFBP 4884. Ce cas illustre bien le rôle des IS dans la plasticité des génomes bactériens qui a déjà été mentionnée (Monteiro-vitorello *et al.*, 2005; Thieme *et al.*, 2005).

Chapitre 5 :

Discussion générale

Une connaissance accrue des déterminants du pouvoir pathogène des bactéries phytopathogènes et de leur spécificité d'hôte aiderait à proposer de nouvelles méthodes de lutte spécifiques des agents ciblés. Afin de coloniser la plante hôte, la réussite des premières étapes de l'interaction entre une plante et ses bio-agresseurs est primordiale pour provoquer la maladie. Les étapes précoces du processus infectieux comprennent la détection de signaux attractifs permettant à la bactérie de se diriger vers les sites d'entrée, et l'installation par adhésion des bactéries et formation de biofilms sur et dans leur hôte après pénétration. Ensuite, les bactéries peuvent se multiplier et sécréter les effecteurs responsables des perturbations tissulaires et cellulaires de l'hôte se manifestant par l'apparition de symptômes. Autant les mécanismes impliqués dans l'interaction après la phase de pénétration des bactéries dans l'hôte font l'objet de très nombreux travaux, autant le déterminisme des étapes précoces de l'interaction est encore mal connu. Des travaux conduits précédemment dans l'équipe ont montré que le répertoire de gènes codant les MCP, les senseurs des régulateurs à deux composantes, les TBDT et les adhésines corrèle avec le regroupement des souches de *Xanthomonas* en pathovars, c'est-à-dire avec leur spécialisation parasitaire (Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011). L'objectif de mon travail de thèse était d'acquérir de plus amples connaissances sur les rôles du chimiotactisme et de la mobilité flagellaire dans la spécificité d'hôte et la fitness des *Xanthomonas*.

1. Les *Xanthomonas* ont un nombre élevé de gènes codant les MCP

Nous avons montré que les *Xanthomonas* ont en moyenne 21 gènes contenant un domaine MA, donc susceptibles de coder des MCP. Ce nombre est relativement élevé. En effet, il a été montré, chez les bactéries mobiles, que le nombre moyen de gènes codant les MCP est de 13,9 par génome (Lacal *et al.*, 2010). Pour qu'un MCP soit considéré comme fonctionnel, il doit être composé d'au moins un domaine MA et d'un domaine senseur (Alexandre, 2010; Lacal *et al.*, 2010; Krell *et al.*, 2011). Sur la base de la prédiction des domaines des MCP de *Xcc* ATCC 33913, nous suggérons que parmi les 19 gènes prédits, 13 coderaient des MCP ayant les domaines minimaux requis pour être fonctionnels. Aux six gènes codant des fragments de MCP contenant le domaine MA, nous pouvons associer trois gènes, dont deux situés dans l'îlot dédié au chimiotactisme et à la mobilité, qui codent uniquement des domaines senseurs et des hélices transmembranaires. Certains de ces neuf gènes pourraient probablement être co-

transcrits pour former des MCP complets selon le modèle proposé pour CetAB chez *Campylobacter jejuni* (Reuter et van Vliet, 2013). C'est très probablement le cas car l'analyse transcriptomique de *Xcc* 8004 montre que les orthologues des couples *XCC1873-XCC1874* et *XCC1881-XCC1882* sont tous transcrits, comme le sont aussi les 17 autres gènes codant des MCP, et présentent par couple un même niveau d'expression (voir la figure 3.1 des résultats complémentaires du chapitre 3). Par des études de génétique fonctionnelle, nous avons montré qu'au moins un gène parmi ces 13, *hsbI* (*XCC0324*), code un MCP fonctionnel.

Parmi les 13 MCP de *Xcc* ATCC 33913, neuf seraient des chémorécepteurs présentant au moins un domaine senseur périplasmique de type Cache pour deux d'entre eux, et de type 4HB_MCP pour les sept autres. Cinq MCP ont au moins un senseur cytoplasmique et pourraient être impliqués dans la détection de petites molécules ou dans le tactisme énergétique intracellulaire pour ceux présentant un domaine PAS. Le rôle de ces senseurs dans la vie de *Xcc* et plus généralement des *Xanthomonas* est totalement méconnu. Interviennent-ils dans l'adaptation à des niches métaboliques (chémosenseurs), à des niches spatiales (tactisme pour l'énergie) conférant un avantage adaptatif à ces bactéries pour la colonisation de leur hôte ou dans d'autres étapes de leur vie, par exemple la survie ? Il a été démontré récemment que le tactisme pour l'énergie est impliqué dans l'adaptation de *S. typhimurium* aux niches inflammatoires lors de l'infection (Rivera-Chávez *et al.*, 2013). Chez *Xcc*, trois MCP présentent un domaine senseur de type PAS, et sont donc potentiellement impliqués dans le tactisme pour l'énergie intracellulaire. Il s'agit de *XCC0324*, *XCC1727* et *XCC1869*. *XCC0324* ancré dans la membrane plasmique présente un seul domaine PAS cytoplasmique. *XCC1727* est un senseur cytoplasmique libre, non ancré dans la membrane plasmique et présente trois domaines senseurs PAS. *XCC1869*, quant à lui, est ancré dans la membrane et présente deux domaines senseurs. Le senseur de type 4HB_MCP est périplasmique, tandis que le domaine PAS est cytoplasmique. Les bactéries du genre *Xanthomonas* sont, pour les mieux connues d'entre elles, des bactéries phytopathogènes généralement capables de vie épiphyte (Jacques *et al.*, 2005; Büttner et Bonas, 2010), mais également capable de coloniser les espaces intercellulaires des parenchymes, voire le xylème (Ryan *et al.*, 2011). Elles peuvent survivre sur les résidus de culture laissés sur le sol (Vicente et Holub, 2012; EFSA Panel on Plant Health, 2014b), ou survivre de longues périodes associées aux graines de leurs plantes hôtes (Darsonval *et al.*, 2009; Darrasse *et al.*, 2010; EFSA Panel on Plant Health, 2014a). Ces bactéries doivent donc faire face aux conditions physico-chimiques instables et variables de la phyllosphère (faible disponibilité en nutriments et en eau, ruissellement lors des pluies, rayonnements UV, alternance de températures...), à l'oligotrophie de l'apoplasme et du xylème associée à des concentrations sans doute élevées en composés

antimicrobiens (Buhtz *et al.*, 2004; Yadeta et Thomma, 2013; Minibayeva *et al.*, 2014), mais elles doivent aussi être capables de faire face aux différentes conditions physico-chimiques retrouvées dans les matières en décomposition dans le sol (grande disponibilité en nutriments, mais également forte compétition pour l'accès à ces nutriments), au stress hydrique voire osmotique dans les graines (Hsieh et Buddenhagen, 1974; Bashan *et al.*, 1982; Graham, 1989), ainsi qu'à la compétition avec les autres microorganismes composant les microbiotes de ces environnements. Tous les types de MCP que nous avons décrits chez *Xcc* (huit chémorécepteurs, quatre senseurs tactiques pour l'énergie et un senseur mixte) pourraient permettre l'adaptation des bactéries à ces environnements variés en intervenant de manière séquentielle pour *in fine* permettre la multiplication de la bactérie dans un environnement précis et donc avoir un rôle primordial dans la fitness des *Xanthomonas* dans ces multiples environnements.

2. Hsb1 est présent dans un seul clade chez les *Xanthomonas*

Notre analyse de la distribution de Hsb1 par OrthoMCL montre que ce MCP n'est pas spécifique de *X. campestris*. Notre analyse a été conduite sur l'ensemble du genre *Xanthomonas* puisqu'elle comprend les séquences génomiques de 70 taxons différents de ce genre représentant toutes les espèces décrites à ce jour et de nombreux taxons infra spécifiques. Elle complète donc le travail conduit par Mhedbi-Hajri et collègues (2011) qui était centré principalement sur les espèces *X. axonopodis* et *X. campestris*. Hsb1 est présent chez *X. campestris*, et chez certains *X. hortorum*, *X. arboricola*, *X. dyei* et *X. pisi*. Etant présent et distribué dans la branche phylogénétique regroupant les espèces *X. campestris*, *X. cynarae*, *X. gardneri*, *X. hortorum*, *X. populi*, *X. arboricola*, *X. vesicatoria*, *X. dyei* et *X. pisi*, l'ancêtre du gène *hsb1* a dû être acquis par le plus récent ancêtre commun de ces souches. Dans ce scénario, ce gène aurait ensuite été perdu par *Xci* et par quelques souches d'un clade rassemblant *X. cynarae*, *X. gardneri*, *X. hortorum* et *X. populi*, d'un autre rassemblant *X. arboricola* et d'un autre rassemblant *X. vesicatoria*, *X. dyei* et *X. pisi*. Il est intéressant de remarquer que pour *X. arboricola* pv. *juglandis*, les souches CFBP 7179 et CFBP 2528 auraient perdu *hsb1* tandis que les souches CFBP 7634 et CFBP 7651 ont encore un allèle de type II de *hsb1*. Or, les deux premières souches sont pathogènes du noyer sur lequel elles provoquent le chancre vertical

suintant tandis que les deux dernières ne sont pas pathogènes du noyer. On peut supposer que ces deux souches non pathogènes colonisent la surface des feuilles, mais ne pénètrent pas dans les tissus. Aussi, nous pouvons émettre l'hypothèse que Hsb1 jouerait un rôle chez CFBP 7634 et CFBP 7651 dans le confinement en surface des tissus du noyer.

Nous avons montré qu'il existe deux types d'allèles de *hsb1*. Le type I est spécifique de *X. campestris*, espèce pathogène des *Brassicaceae* et le type II est distribué dans les espèces *X. hortorum*, *X. arboricola*, *X. dyei* et *X. pisi*, pathogènes de plantes hôtes diverses mais d'aucune *Brassicaceae*. Des signaux nets de divergence adaptative sont notés entre ces deux types d'allèles. Les allèles de type I montrent très peu de polymorphisme suggérant qu'ils seraient soumis à sélection purifiante. Ceci pourrait s'expliquer par une pression de sélection forte qui serait imposée par l'hôte. Il est en effet important de noter que seulement deux sites dans la séquence des domaines PAS des allèles de type I de *hsb1* présentent des mutations non-synonymes. Nous pouvons donc supposer qu'aucun polymorphisme modifiant la structure 3D du domaine senseur et sa spécificité de liaison n'est notée dans les domaines PAS des MCP de type I. Les allèles de type II sont plus polymorphes que ceux de type I. Ils accumulent, en effet, beaucoup de mutations non-synonymes dans la séquence codant le domaine senseur de Hsb1. Ceci pourrait indiquer que ces allèles de type II seraient soumis à de la sélection diversifiante, ce qui pourrait s'expliquer par les environnements variés que colonisent ces souches, puisqu'elles sont pathogènes d'hôtes aussi divers que la carotte, le noyer, l'arbre de Noël de Nouvelle-Zélande (*Metrosideros excelsa*) ou le pois. Afin de coloniser efficacement chacun de ces divers environnements les allèles de type II ont donc probablement été soumis chacun à de la sélection purificatrice ce qui globalement apparaît comme de la divergence adaptative.

3. *hsb1* est localisé dans la cassette d'un intégron

Les allèles de types I et II du gène *hsb1* sont localisés dans la suite de cassettes de l'intégron chromosomique décrit par Gillings et collègues (2005). Le scénario évolutif proposé par ces auteurs pour cet intégron est le suivant : (i) Un intégron ancestral contenant au moins une intégrase (*IntI*) fonctionnelle et le site *attI* aurait vraisemblablement été acquis dans le génome de l'ancêtre commun des *Xanthomonas* à côté du gène *ilvD*. (iii) Cet intégron actif aurait ensuite recruté des cassettes générant des lignées génétiques différentes ayant chacune une suite particulière de cassettes. (iv) L'inactivation de *intI* aurait alors fixé les suites de cassettes de manière concomitante à leur spécialisation ou à leur sélection en tant que pathovars

d'hôtes différents. (v) Des réarrangements génétiques ultérieurs dus à des activités intégrase en *trans* ou de la recombinaison homologue auraient accompagné la spécialisation de niche. On peut faire l'hypothèse que le gène *hsbI*, d'origine inconnue, aurait été capturé dans une cassette chez l'ancêtre commun aux espèces *X. campestris*, *X. cynarae*, *X. gardneri*, *X. hortorum*, *X. populi*, *X. arboricola*, *X. vesicatoria*, *X. dyei* et *X. pisi*. Avant l'inactivation des intégrases, ces suites de cassettes auraient évolué conduisant à des patrons différents au sein de ce clade. Cette activité a pu conduire à la perte de *hsbI* dans certaines suites. Cette perte peut également être ultérieure à l'inactivation de l'intégrase. Il semble que l'intégrase ne soit généralement plus fonctionnelle pour la majorité des souches étudiées par Gillings et collègues (2005) puisque ces gènes d'intégrase *intI* présentant des indels (région de l'ADN présente chez certaines souches (insertion) mais absente de souches phylogénétiquement proches (deletion)) pouvant générer un décalage du cadre de lecture (frameshifts). L'intégrase de la souche ATCC 33913 du pathovar *campestris* présente un gène intact et pourrait donc être encore fonctionnelle. Gillings et collègues (2005) notent, cependant, que la conservation des suites de cassettes chez ce pathovar *campestris* interroge sur la fonctionnalité de cette intégrase. Contrairement à ces auteurs, nos travaux montrent que les patrons des suites de cassettes des trois souches de *Xcc* incluses dans notre étude sont différents. Seules les souches ATCC 33913 et 8004 qui sont phylogénétiquement très proches présentent le même patron, qui diffère en revanche du patron de la souche B100.

Est-ce que les suites cassettes ont pris un rôle actif dans l'adaptation à l'hôte des souches ? Gillings et collègues (2005) n'apportent aucun élément en ce sens concernant cet intégron et la spécialisation de niche des *Xanthomonas*. Par ailleurs, il a déjà été montré que des gènes de cassettes d'intégrons pouvaient présenter un avantage sélectif pour la bactérie. Cela peut être lié à la présence de gènes de résistance à des antibiotiques (Rowe-Magnus et Mazel, 2002; Stalder *et al.*, 2012). C'est par exemple le cas d'un intégron contenant le gène *aadA1*, conférant la résistance à la streptomycine à *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xu *et al.*, 2013). D'autres auteurs montrent que des souches d'*Escherichia coli* productrices de shiga toxines (STEC) possèdent des intégrons qui codent des gènes de résistance à des antibiotiques comme le triméthoprim et le sulfaméthoxazole (Zhao *et al.*, 2001). Nous apportons des éléments indiquant que *hsbI*, gène présent dans la suite des cassettes de l'intégron de *Xcc* et *Xcr* participerait activement à la spécialisation d'hôte.

4. Hsb1 contient un domaine PAS cytoplasmique

Hsb1 est constitué de deux régions transmembranaires, suivies d'un domaine PAS cytoplasmique, d'un domaine HAMP et d'un domaine MA. Le domaine PAS de Hsb1 appartiendrait à la superfamille des PYP-like sensor domain (PYP : Photoactive Yellow Protein). La protéine de type PYP la mieux caractérisée est Ppr de *Rhodospirillum centenum*. Le gène *ppr* code un domaine PYP absorbant le bleu couplé à un domaine bactériophytochrome absorbant le rouge. La photostimulation à la lumière bleue induit la mobilité chez *Rhodospirillum centenum* (Jiang *et al.*, 1999; Henry et Crosson, 2011). Cette super-famille contient 7 familles de domaines (PYP-like, Heme-binding PAS domain, Flavin-binding PAS domain, N-terminal PAS domain of PAS kinase, Hypoxia-inducible factor Hif2a C-terminal domain, PAS domain of steroid receptor coactivator 1A NCo-A1 et BphP N-terminal domain-like). Bien qu'il soit connu que les alignements de séquences ne donnent que peu d'éléments quant à la proximité structurale et de fonction de ces domaines (Henry et Crosson, 2011), nous avons aligné la séquence du domaine PAS de Hsb1 avec les séquences de ces différents domaines. Globalement les alignements sont mauvais. Le meilleur est avec les deux représentants de la famille PYP-like (SCOP55786). Parmi les trois résidus essentiels pour la liaison avec l'acide hydroxy cinnamique, co-facteur conférant la sensibilité à la lumière bleue et proche UV (Henry et Crosson, 2011), aucun n'est conservé dans le domaine PAS de Hsb1. Ainsi, il semble qu'Hsb1 présente un domaine PAS particulier. Un argument de type classification des MCP vient également renforcer cette idée. Actuellement, trois types de MCP contenant des domaines PAS ont été décrits : (i) les Aer, (ii) les AerC, et (iii) les MCP contenant un domaine PAS générique (Alexandre, 2010). Les Aer, homologues des Aer de *E. coli* contiennent un domaine PAS cytoplasmique suivi de deux régions transmembranaires, d'un HAMP et d'un domaine MA. Ils sont donc ancrés dans la membrane cytoplasmique. Les AerC, homologues des AerC d'*Azospirillum brasilense*, ne contiennent pas de régions transmembranaires. Ils sont constitués d'un à trois domaines PAS et d'un domaine MA. Les AerC sont des MCP cytoplasmiques. Les Aer et les AerC sont des MCP dont les domaines PAS se lient au FAD. D'après Xie et collègues (2010), tous les domaines PAS des Aer et AerC ont un résidu tryptophane strictement conservé, leur permettant de se lier au FAD. Ce résidu n'est pas conservé chez Hsb1. Hsb1 ne présente donc pas d'homologie fonctionnelle avec les senseurs des Aer et AerC. Les MCP contenant un domaine PAS générique sont ancrés dans la membrane. Les domaines PAS génériques sont très mal décrits dans la littérature. Ils ne

contiennent pas de site de liaison au FAD. Ils peuvent contenir un domaine HAMP ou un autre domaine senseur périplasmique. Pour résumer, nos données ne montrent pas d'homologie fonctionnelle avec Aer et AerC et la structure de Hsb1 ne ressemble à aucune des autres structures décrites par Alexandre (2010). Néanmoins, il semble que la structure de Hsb1 la plus ressemblante à celles déjà décrites est celle des MCP contenant un domaine PAS générique.

5. Le chimiotactisme et Hsb1 interviennent pour permettre la pénétration de *Xcc* ATCC 33913 dans les tissus des plantes hôtes

Afin de comprendre le rôle de Hsb1 dans la fitness de *Xcc* ATCC 33913 sur plantes hôtes et non-hôtes, nous avons analysé la dynamique des populations *in planta* pour la souche sauvage et une souche mutante dans laquelle le gène *hsb1* a été totalement supprimé. Nos résultats montrent que Hsb1 favorise significativement la capacité de *Xcc* à pénétrer dans les tissus foliaires des plantes hôtes lui permettant ensuite de s'y installer alors qu'il limiterait la capacité de pénétration dans les tissus des plantes non-hôtes. Ces effets sont statistiquement significatifs mais également biologiquement puisqu'ils sont au moins d'un facteur 10 et ont été obtenus de manière indépendante au moins trois fois et sur plusieurs plantes hôtes et plusieurs plantes non-hôtes. On note également que ces comportements sont acquis très tôt puisque des différences sont déjà visibles 24 h après l'inoculation. Nous avons aussi montré que le mutant de *Xcc* ATCC 33913 dans le gène *hsb1* était incapable d'atteindre un point de blessure dans la nervure centrale des feuilles de chou et d'y coloniser les vaisseaux du xylème afin d'y provoquer la nervation noire. Les mêmes observations ont été faites pour une souche délétée du phospho-relais CheY. Ceci indique que le chimiotactisme est un élément central pour la pénétration de *Xcc* dans sa plante hôte, et que la seule perception par Hsb1 de l'environnement plante hôte ou plante non-hôte est responsable du phénotype observé, puisque les mutants dans *hsb1* et dans *cheY* ont des phénotypes très similaires. Yao et Allen (2007) montrent que des mutants dans les gènes *aer1* et *aer2*, déficients dans l'aérotactisme, forment des biofilms plus épais que le parent sur les surfaces abiotiques. Ces mutants sont aussi altérés dans leur capacité à détecter l'oxygène. Ces mutants sont légèrement retardés dans le développement de la maladie sur tomate et un double mutant dans ces deux gènes est affecté significativement dans sa capacité à atteindre rapidement les racines de tomates pour les coloniser. Ils en concluent que

le tactisme pour l'énergie permet à *Ralstonia solanacearum* de rapidement localiser et coloniser les racines des plants de tomate. En revanche, le rôle d'Aer1 et Aer2 dans d'autres environnements (plantes non-hôtes, eau, sol...) est inconnu. Chez *Salmonella typhimurium*, Rivera-Chávez et collègues (2013) montrent, dans une étude très complète, qu'initialement, donc en l'absence d'infection, Trg procure un avantage à *S. typhimurium* dans l'intestin. Comme chez *E. coli*, il est supposé que cette bactérie soit attirée, grâce à Trg, vers les concentrations élevées en galactose de l'épithélium intestinal (Harayama *et al.*, 1979; Hazelbauer et Harayama, 1979; Kondoh *et al.*, 1979). L'inflammation est ensuite provoquée par les deux SST3 de *S. typhimurium* (Waterman et Holden, 2003; Figueira et Holden, 2012). La bactérie est alors attirée grâce à Aer et à Trg vers des niches spatiales favorables à sa multiplication, donc *in fine* à sa transmission (Rivera-Chávez *et al.*, 2013). Ces deux MCP détectent des signaux différents. Le tactisme médié par Aer pour le tétrathionate fonctionne au travers de la perception de la modification de l'état redox intracellulaire. En anaérobiose, Tsr, senseur de force proton motrice, sent les basses concentrations en nitrate, ce qui est le cas *in vivo*. Avec ces deux MCP, *S. typhimurium* est attirée vers des espaces anaérobies de la partie basse de l'intestin dans lesquelles elle se multiplie efficacement et donc augmente ses chances de dispersion (Rivera-Chávez *et al.*, 2013). Dans la littérature, il est aussi connu qu'un MCP, Tlp1, permet à *Azospirillum brasilense* de coloniser efficacement la racine de blé, son hôte (Greer-Phillips *et al.*, 2004). Tlp1 est aussi tactique pour l'énergie. Son domaine senseur prédit est périplasmique. En plus de l'inefficacité dans la colonisation des racines de blé, les auteurs ont montré que le mutant d'*A. brasilense* est aussi altéré dans sa capacité à être tactique pour des substrats rapidement oxydables (acides organiques, glycérol et maltose), pour des accepteurs finaux d'électrons (oxygène et nitrate), pour le statut redox.

Une originalité de notre travail est l'analyse du rôle d'un MCP, Hsb1, dans une gamme de plantes hôtes et non-hôtes. Le fait que Hsb1 influence le comportement et la fitness de *Xcc* à la fois sur plantes hôtes et non-hôtes est un résultat très intéressant mais il n'en est pas moins troublant car il indiquerait que Hsb1 détecterait au moins une molécule commune à toutes les plantes hôtes et une molécule commune à toutes les plantes non-hôtes. Trouver une molécule commune aux plantes hôtes de *Xcc* et *Xcr* n'est pas compliqué puisque ces plantes hôtes appartiennent toutes à la famille des *Brassicaceae* et que ces plantes ont comme caractéristique commune de contenir des glucosinolates (Fahey *et al.*, 2001; Bressan *et al.*, 2009), composés soufrés très rarement présent dans les plantes d'autres familles botaniques. En revanche identifier une molécule commune aux plantes non-hôtes, soit toutes les autres familles botaniques est pratiquement impossible. Il faudrait donc imaginer que c'est la détection des

glucosinolates qui permet la pénétration dans les tissus des plantes hôtes alors que l'absence de détection des glucosinolates confinerait les bactéries en surface des autres plantes, n'étant pas attirées au niveau d'une voie d'entrée. Une hypothèse alternative est que Hsb1 serait détecté par les plantes comme un MAMP et qu'il induirait des réactions de défense, éventuellement contournées dans le cas d'une situation compatible par les effecteurs de type 3.

6. Hsb1 n'élécite pas les réactions de défense de la tomate, plante non-hôte de *Xcc*

Nous avons voulu vérifier cette hypothèse chez la tomate, plante non-hôte de *Xcc*. Afin d'avoir une vision assez exhaustive des différentes voies et niveaux de défense, nous avons utilisé une puce faible densité (qPFD) (Brisset et Dugé de Bernonville, 2011). Cette puce permet de suivre l'expression de 26 gènes codant des protéines qui interviennent dans la plupart des réactions de défenses mises en place par la plante pour répondre à l'attaque d'un agent pathogène dont la modification de la paroi, la voie des phénylpropanoïdes, la voie des isoprénoïdes, les protéines PR, le stress oxydatif et les voies de signalisation de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'éthylène. Sur les 26 gènes de défense dont l'expression relative a été mesurée, aucun n'est plus fortement ni différentiellement induit par Hsb1 dans la souche sauvage comparativement au mutant où le gène est absent. Cela indique que Hsb1 ne serait pas un éliciteur des réactions de défense des plantes. Est-il possible que les voies de défense induites par Hsb1 ne puissent être mesurées par cette méthode ? Le postulat donné par les auteurs de la qPFD est le suivant : il n'existe pas de voies de défenses décrites à ce jour, qui s'activeraient de manière totalement indépendante des gènes suivis par la qPFD. Parmi les voies de défenses non suivies, il y a notamment des voies du métabolisme secondaire spécifiques de certaines espèces, dont par exemple, la voie des glucosinolates, caractéristique des *Brassicaceae* (Marolleau *et al.*, 2013). Si le postulat précédent est vrai, alors si des voies du métabolisme secondaire étaient activées, certains gènes de la qPFD devraient être aussi induits ce qui n'est pas le cas. Peut-être aussi que la différence quantitative entre l'induction des gènes par le mutant dans le gène *hsb1* et le parent est trop ténue pour être mesurée par cette méthode. Il pourrait s'agir d'une autre molécule dont la détection par la plante engendrerait des réactions de défense masquant celles dues à Hsb1. Il est plus probable, dans ce cas, que la molécule soit un ET3 engendrant une réaction de défense très forte, de type ETI, qui masquerait

celles, plus faibles, dues à Hsb1, potentiellement de type MTI (Jones et Dangl, 2006). Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait construire un double mutant dans les *hrcV* et *hsb1* et de comparer les défenses induites sur tomate à un simple mutant dans le gène *hrcV*, à un simple mutant dans le gène *hsb1* et au parent sauvage. Si le mutant dans le gène *hrcV* induit plus de défense que le double mutant, alors Hsb1 est bien un MAMP. Au contraire, s'il n'y a pas de différences observées dans les réactions de défenses, entre le double mutant et le simple mutant dans le gène *hrcV*, alors Hsb1 n'est pas un éliciteur des réactions de défense des plantes. Dans ce cas, le différentiel de comportement, observé *in planta* entre le mutant *hsb1* et le parent, semble bien être dû au rôle de Hsb1 dans la détection de signaux attractifs des plantes hôtes et répulsifs des plantes non-hôtes.

7. Hsb1 détecte la sinigrine et la L-phénylalanine mais *Xcc* ne métabolise aucune des deux molécules

A l'aune de ces résultats, nous avons formulé l'hypothèse suivante : Hsb1 détecte des signaux attractifs des plantes hôtes et répulsifs des plantes non-hôtes permettant ou limitant la pénétration de *Xcc* ATCC 33913 dans les tissus foliaire de ces plantes. Nous avons vérifié cette hypothèse *in vitro*, en tubes capillaires, en testant différents types d'extraits de plantes hôtes et non-hôtes. Ainsi, il apparaît clairement que Hsb1 détecte bien un(des) signal(aux) attractif(s) des plantes hôtes et répulsifs des plantes non-hôtes. Afin de préciser les molécules ayant un effet sur Hsb1, nous avons testé une gamme de molécules telles que des acides aminés, des sucres et un glucosinolate. Parmi ces molécules, seules la sinigrine et la L-phénylalanine sont nettement attractives pour Hsb1. La sinigrine est un glucosinolate présent chez de nombreuses *Brassicaceae* dont *Brassica oleracea*, *A. thaliana* et *B. nigra* (Rangkadilok *et al.*, 2002; Abdel-Farid *et al.*, 2006). Lors d'une blessure, les glucosinolates sont mis en contact avec la myrosinase, une β -thioglucosidase normalement stockée dans un compartiment cellulaire différent, et ils sont dégradés par celle-ci (Kliebenstein *et al.*, 2005). Il existe d'autres processus de dégradation des glucosinolates. Lors de procédés agro-alimentaires comme la cuisson qui peuvent désactiver la myrosinase, la sinigrine est apportée par le bol alimentaire directement dans l'intestin. Elle est alors métabolisée par des microorganismes du microbiote digestif humain tels que *Bacteroides thetaiotaomicron* (Elfoul *et al.*, 2001; Krul *et al.*, 2002). Les produits de dégradation des glucosinolates sont en général répulsifs pour les herbivores mais

ont aussi des propriétés antimicrobiennes (Bohinc *et al.*, 2012; Dufour *et al.*, 2012). Nous ne connaissons pas de travaux montrant qu'ils pourraient être attractifs pour des bactéries. Il est en revanche très bien documenté qu'ils peuvent être attractifs pour certains insectes et favoriser ainsi leur ponte (Mewis *et al.*, 2002; Miles *et al.*, 2005; Redovniković *et al.*, 2008). Ce n'est pas la première fois qu'un produit de défense est détecté comme étant attractif pour une bactérie phytopathogène. Le jasmonate, hormone de signalisation des défenses, est attractif pour *Dickeya dadantii* (Maria Antúnez-Lamas *et al.*, 2009).

Nous montrons également que Hsb1 est attiré par la L-phénylalanine. Hsb1 n'est pas le seul MCP à détecter plusieurs molécules. D'autres auteurs ont montré qu'un MCP est capable de détecter de multiples acides aminés. Chez *Vibrio cholerae*, Mlp24 détecte au moins 19 acides aminés dont la sérine, l'asparagine et la proline (Nishiyama *et al.*, 2012). Les auteurs ont montré que ces acides aminés se lient directement au domaine périplasmique de Mlp24, permettant ainsi la réponse chimiotactique. La structure de Hsb1 laisse penser qu'il s'agit d'un MCP de type senseur tactique pour l'énergie. Ce type de MCP détecte indirectement les chémoeffecteurs *via* leur(s) effet(s) sur les niveaux d'énergie intracellulaire, en particulier sur le système de transport d'électrons, ce qui va de pair avec leur utilisation par la cellule (Alexandre, 2010). Or, nous montrons que ni la sinigrine, ni la L-phénylalanine ne sont métabolisées par *Xcc*. Ainsi, le(s) type(s) de signal(aux) détecté(s) par Hsb1 reste(nt) toujours inconnu(s). Quelles variations intracellulaires la sinigrine ou la L-phénylalanine provoquent afin d'être détectées comme des attractants par Hsb1 ? Est-ce que, passivement ou *via* un(des) transporteur(s), la sinigrine et la L-phénylalanine peuvent traverser la membrane cytoplasmique et ainsi atteindre le cytoplasme et modifier son pH ou son potentiel redox ? A notre connaissance, aucun transporteur de glucosinolates n'a été décrit chez les bactéries et chez *Xcc*. Il n'y a aucune indication que l'environnement génomique de *hsb1* puisse contenir des gènes codant des MAMP ou des transporteurs de glucosinolates ou d'acides aminés.

8. *hsb1* de *Xcc* 8004 est induit par HrpG

Afin d'avoir des précisions sur la dynamique d'expression des gènes codant les MCP et du gène codant Hsb1 chez *Xcc*, nous avons pu avoir accès aux données de transcriptomique par RNAseq de la souche *Xcc* 8004. Cette analyse a été réalisée sur *Xcc* 8004 et un mutant *Xcc8004::hrpG**, exprimant constitutivement HrpG*. Cette protéine phosphorylée induit la surexpression des gènes de la cascade transcriptionnelle du régulon de HrpG, à savoir les gènes

codant des protéines impliquées dans la virulence (dont le SST3, les ET3, des TBDT, des adhésines) (Noël *et al.*, 2001; Koebnik *et al.*, 2006; Valls *et al.*, 2006; Blanvillain *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2011). L'expression constitutive de *hrpG* a pour objectif de mimer *in vitro* en milieu riche, les conditions qui seraient rencontrées *in planta*. Ces données d'expression sont comparées avec les données d'expression de la souche sauvage dans le même milieu. Ces données de transcriptomique montrent que les 19 gènes codant les MCP (contenant un domaine MA) sont exprimés constitutivement chez *Xcc* 8004 et pouvant aller jusqu'à un niveau d'expression comparable à celui du gène de la glutamine synthétase *glnA*. L'orthologue de *hsb1* chez *Xcc* 8004 est significativement induit par HrpG et donc potentiellement *in planta*. Si *hsb1* est induit par HrpG *in planta*, alors ce MCP serait co-exprimé et co-traduit avec les facteurs de virulence et d'agressivité. Cela permettrait à *Xcc* de coloniser et d'infecter efficacement les tissus des *Brassicaceae*. On peut supposer qu'en plus du niveau d'expression constitutive de *hsb1*, la phosphorylation de HrpG induisant l'expression de *hsb1* renforcerait ce comportement tactique. Cependant chez *R. solanacearum*, il a été montré que cette phosphorylation intervient suite à la détection d'un signal de plante non diffusible perçu par le récepteur membranaire PrhA (Aldon *et al.*, 2000). Ce scénario supposerait donc que la bactérie soit déjà en contact étroit avec la plante. Etant donné son rôle dans la surexpression de *hsb1*, il est possible d'envisager que la régulation de *hrpG* puisse s'opérer différemment chez *Xcc*. Récemment, un senseur (HpaS) d'un système de régulation à deux composantes et qui fonctionnerait notamment avec HrpG comme régulateur a été identifié chez *Xcc* (Li *et al.*, 2014). Il détecte un signal plante dont la nature et la localisation restent encore inconnues. De plus au moins un autre régulateur (HpaR1) d'un système à deux composantes dont on ne connaît ni le senseur associé ni le signal intervient également en amont de *hrpG* (An *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014). Par ailleurs, d'autres senseurs pourraient intervenir dans la régulation du chimiotactisme, comme c'est le cas pour d'autres systèmes de régulation à composantes, des gènes de virulence et de mobilité (F.-F. Wang *et al.*, 2010; Tao et He, 2010; Andrade *et al.*, 2014). Les interactions entre ces différents régulateurs restent encore à établir.

9. La mobilité n'est pas une capacité générale des *Xanthomonas*

Le séquençage et l'annotation du génome de *X. fuscans* subsp. *fuscans* (*Xff*) 4834-R montre une délétion de 33 kb dans l'îlot génomique codant le système flagellaire (Darrasse *et al.*, 2013). Comparée à *X. euvesicatoria* 85-10 dont l'îlot génomique codant le système flagellaire est complet et fonctionnel, cette délétion concerne 34 gènes. A la place de ces 34 gènes, il y a une copie complète d'une séquence d'insertion spécifique de *Xff* 4834-R, *ISXfu2*. Or, les *Xanthomonas* sont connus pour être mobiles grâce à un unique flagelle polaire (Swings *et al.*, 1993). *Xff* 4834-R ne l'est pas et au moins 5 % des souches testées, représentant le genre *Xanthomonas*, ont un cluster flagellaire incomplet et ne sont pas mobiles par nage (Darrasse *et al.*, 2013). *Xff* 4834-R a été isolée, à Beaucouzé en 1998, d'une épidémie apportée par un lot de semences contaminées (Jacques *et al.*, 2005). Des souches présentant un cluster flagellaire complet et mobiles par nage ont été isolées de cette même épidémie (Darrasse *et al.*, 2013). C'est le cas de *Xff* CFBP 4884. Nous avons donc fait séquencer le génome de cette souche pour comprendre comment ces deux types de souches pouvaient coexister et éventuellement identifier le mécanisme ayant conduit à la délétion du cluster flagellaire de *Xff* 4834-R. Le génome de *Xff* CFBP 4884 présente un cluster flagellaire complet. En plus des gènes du cluster flagellaire, seulement 12 gènes diffèrent entre les deux souches et ces différences sont principalement dues à des problèmes techniques de séquençage et/ou d'assemblage des séquences de *Xff* CFBP 4884.

Ces deux souches sont donc phylogénétiquement très proches et partagent certainement un ancêtre commun très récent. *Xff* 4834-R aurait donc pu émerger à partir de cet ancêtre. Nous proposons un scénario basé sur une recombinaison homologue entre deux copies de l'*ISXfu2* situées dans le cluster flagellaire de l'ancêtre et encore présentes chez *Xff* CFBP 4884. Cette recombinaison homologue aurait ainsi conduit à l'excision d'une grande partie du cluster flagellaire que l'on peut observer chez *Xff* 4834-R. La profondeur du séquençage n'a pas permis un assemblage complet du génome. Un ensemble de 203 contigs a été obtenu et ces contigs n'ont pas pu être assemblés en partie au niveau des loci des IS. Aussi, nous n'avons pas la preuve formelle du scénario que nous proposons. Afin de valider cette proposition, il pourrait être envisagé de re-séquencer ce génome ou au moins la zone concernant le cluster flagellaire chez *Xff* CFBP 4884 avec une technique non sensible à ces éléments répétés telle que la technique PacBio, par exemple (Au *et al.*, 2012; X. Zhang *et al.*, 2012).

10. Perspectives

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré qu'un senseur du chimiotactisme, Hsb1, permet à *Xcc* de trouver, sans doute *via* la perception des glucosinolates, des sites d'entrée permettant son internalisation dans les tissus des *Brassicaceae*, plantes hôtes, et la confinant en surface des tissus des plantes non-hôtes. La structure de Hsb1 laisse penser qu'il s'agit d'un senseur tactique pour l'énergie. Quel(s) est(sont) le(s) signal(aux) directement détecté(s) par Hsb1 ? Est-ce que la sinigrine et la L-phénylalanine peuvent traverser la membrane cytoplasmique passivement ou *via* un transporteur ? Quelles variations intracellulaires la sinigrine ou la L-phénylalanine provoquent afin d'être détectées comme étant attractive par Hsb1 ? Pour répondre à ces questions, il est possible d'utiliser le test en tubes capillaires qui a été décrit par Shitashiro et collègues (2003) et Yao et Allen (2007). Ce test permet de tester des réponses aéro-tactiques chez les bactéries. Afin de vérifier si la sinigrine ou la L-phénylalanine provoquent des variations de pH intracellulaire, il est possible d'utiliser la technique développée par Olsen et collègues (2002). Cette technique est basée sur la mesure du ratio d'excitation de la GFP (intensité de fluorescence à 410 nm et à 430 nm) en microscopie par fluorescence. Ce ratio varie en fonction du pH intracellulaire et permet donc de mesurer ces variations de pH. Une autre question se pose toujours : est-ce que *hsb1* est exprimé *in planta* ? Afin d'y répondre, une étude d'expression de *hsb1* chez *Xcc* ATCC 33913 pourrait être conduite sur une gamme de plantes hôtes et non-hôtes afin de comprendre la dynamique d'expression de ce gène dans le cadre d'une interaction. Y a-t-il d'autres molécules issues de plantes qui soient attractives ou répulsives pour la bactérie ? Nous avons montré le rôle de Hsb1 dans la spécificité d'hôte de *Xcc*. Il serait intéressant d'étudier le rôle des autres MCP de cette souche. Y a-t-il plusieurs MCP impliqués dans la spécificité d'hôte ? Comment interagissent ces différents MCP ? Interviennent-ils à d'autres étapes du cycle de la bactérie, par exemple pour la contamination des semences ou la survie sur des hôtes alternatifs ? Autant de questions qui permettront de mieux comprendre l'écologie de cette bactérie.

Ce travail pourra et les suivants, pourront, à terme, déboucher sur de nouvelles méthodes de lutte, contre *Xcc*, basée sur la confusion chimique. C'est, par exemple, ce qui est utilisé contre les carpocapses (Schmera et Guerin, 2012). Ces méthodes désorientent, effectivement, les mâles en diffusant des phéromones sexuelles femelles dans l'environnement. Les mâles ont ainsi des difficultés à retrouver une femelle à féconder. Nous pouvons imaginer utiliser des plantes sélectionnées car elles contiennent, ou pour contenir, de hauts niveaux de concentrations

en molécules répulsives pour *Xcc* dans leurs tissus. Cela limiterait *Xcc* à la surface des feuilles limitant son internalisation et donc le développement de la maladie. Il est aussi possible d'envisager de sélectionner les *Brassicaceae* cultivées qui ont une teneur en glucosinolate faible limitant l'attraction de *Xcc*.

Il serait intéressant d'étendre l'étude du rôle du chimiotactisme dans la spécificité d'hôte à d'autres pathogènes. L'essor de la génomique donne accès à de nombreux gènes du chimiotactisme, la comparaison de leurs séquences a permis de repérer des candidats dont le rôle pourrait être étudié.

Références

bibliographiques

- Abdalsamee, M.K., Giampà, M., Niehaus, K., and Müller, C. (2014) Rapid incorporation of glucosinolates as a strategy used by a herbivore to prevent activation by myrosinases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **52**: 115–123.
- Abdel-Farid, I.B., Choi, Y.H., Kim, H.K., van den Hondel, C., van der Meijden, E., and Verpoorte, R. (2006) The role of secondary metabolites in *Arabidopsis* and *Brassica* in the interaction with fungi. *Curr Top. Plant Biol* **7**: 47–73.
- Agneta, R., Möllers, C., De Maria, S., and Rivelli, A.R. (2014) Evaluation of root yield traits and glucosinolate concentration of different *Armoracia rusticana* accessions in Basilicata region (southern Italy). *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **170**: 249–255.
- Aharoni, A., Jongsma, M.A., Kim, T.-Y., Ri, M.-B., Giri, A.P., Verstappen, F.W.A., et al. (2006) Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochem. Rev.* **5**: 49–58.
- Ah-You, N., Gagnevin, L., Grimont, P.A.D., Brisse, S., Nesme, X., Chiroleu, F., et al. (2009) Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the *Anacardiaceae* and their relatedness to species of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 306–18.
- Aires, A., Mota, V.R., Saavedra, M.J., Monteiro, A.A., Simões, M., Rosa, E.A.S., and Bennett, R.N. (2009) Initial in vitro evaluations of the antibacterial activities of glucosinolate enzymatic hydrolysis products against plant pathogenic bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **106**: 2096–105.
- Airola, M. V, Sukomon, N., Samanta, D., Borbat, P.P., Freed, J.H., Watts, K.J., and Crane, B.R. (2013) HAMP domain conformers that propagate opposite signals in bacterial chemoreceptors. *PLoS Biol.* **11**: e1001479.
- Alavi, S.M., Sanjari, S., Durand, F., Brin, C., Manceau, C., and Poussier, S. (2008) Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multip. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 3295–301.
- Aldon, D., Brito, B., Boucher, C., and Genin, S. (2000) A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J.* **19**: 2304–14.
- Aldridge, P., Karlinsey, J.E., Becker, E., Chevance, F.F. V, and Hughes, K.T. (2006) Flk prevents premature secretion of the anti-sigma factor FlgM into the periplasm. *Mol. Microbiol.* **60**: 630–43.
- Alexandre, G. (2010) Coupling metabolism and chemotaxis-dependent behaviours by energy taxis receptors. *Microbiology* **156**: 2283–93.
- Alfano, J.R. and Collmer, A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**: 385–414.

- Allen, J.F., de Paula, W.B.M., Puthiyaveetil, S., and Nield, J. (2011) A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends Plant Sci.* **16**: 645–55.
- Alonso, J.M. and Stepanova, A.N. (2004) The ethylene signaling pathway. *Science* (80-.). **306**: 1513–1515.
- Al-Shehbaz, I.A., Beilstein, M.A., and Kellogg, E.A. (2006) Systematics and phylogeny of the *Brassicaceae* (*Cruciferae*): an overview. *Plant Syst. Evol.* **259**: 89–120.
- Altenbach, D. and Robatzek, S. (2007) Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **20**: 1031–9.
- Alvarez, A.M. (2001) Black rot of crucifers. In: Slusarenko, A.J., Fraser, R.S., van Loon, L.C. (Eds.), *M. of R. to P.D.S.* (ed).
- An, S.-Q., Febrer, M., McCarthy, Y., Tang, D.-J., Clissold, L., Kaithakottil, G., et al. (2013) High-resolution transcriptional analysis of the regulatory influence of cell-to-cell signalling reveals novel genes that contribute to *Xanthomonas* phytopathogenesis. *Mol. Microbiol.* **88**: 1058–69.
- An, S.-Q., Lu, G.-T., Su, H.-Z., Li, R.-F., He, Y.-Q., Jiang, B.-L., et al. (2011) Systematic mutagenesis of all predicted *gntR* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* reveals a GntR family transcriptional regulator controlling hypersensitive response and virulence. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **24**: 1027–39.
- Anantharaman, V. and Aravind, L. (2000) Cache - a signaling domain common to animal Ca(2+)-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 535–537.
- Anantharaman, V. and Aravind, L. (2001) The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 579–82.
- Ancillo, G., Hoegen, E., and Kombrink, E. (2003) The promoter of the potato chitinase C gene directs expression to epidermal cells. *Planta* **217**: 566–76.
- Anders, S. and Huber, W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**: R106.
- Andrade, M.O., Farah, C.S., and Wang, N. (2014) The post-transcriptional regulator *rsmA/csrA* activates T3SS by stabilizing the 5' UTR of *hrpG*, the master regulator of *hrp/hrc* genes, in *Xanthomonas*. *PLoS Pathog.* **10**: e1003945.
- Andrews, J.H. (1992) Biological control in the phyllosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**: 603–635.
- Andrews, J.H. and Harris, R.F. (2000) The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol* **38**: 145–180.

- Antúñez-Lamas, M., Cabrera, E., Lopez-Solanilla, E., Solano, R., González-Melendi, P., Chico, J.M., et al. (2009) Bacterial chemoattraction towards jasmonate plays a role in the entry of *Dickeya dadantii* through wounded tissues. *Mol. Microbiol.* **74**: 662–71.
- Antúñez-Lamas, M., Cabrera-Ordóñez, E., López-Solanilla, E., Raposo, R., Trelles-Salazar, O., Rodríguez-Moreno, A., and Rodríguez-Palenzuela, P. (2009) Role of motility and chemotaxis in the pathogenesis of *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia chrysanthemi* 3937). *Microbiology* **155**: 434–42.
- Aravind, L. and Ponting, C.P. (1997) The GAF domain: an evolutionary link phototransducing proteins. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 458–459.
- Armitano, J., Méjean, V., and Jourlin-Castelli, C. (2013) Aerotaxis governs floating biofilm formation in *Shewanella oneidensis*. *Environ. Microbiol.* **15**: 3108–3118.
- Au, K.F., Underwood, J.G., Lee, L., and Wong, W.H. (2012) Improving PacBio long read accuracy by short read alignment. *PLoS One* **7**: e46679.
- Bahar, O., Goffer, T., and Burdman, S. (2009) Type IV Pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Mol. plant-microbe Interact.* **22**: 909–20.
- Bai, F., Minamino, T., Wu, Z., Namba, K., and Xing, J. (2012) Coupling between switching regulation and torque generation in bacterial flagellar motor. *Phys. Rev. Lett.* **108**: 178105.
- Baker, M.D., Wolanin, P.M., and Stock, J.B. (2006) Systems biology of bacterial chemotaxis. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 187–92.
- Baraquet, C., Théraulaz, L., Iobbi-Nivol, C., Méjean, V., and Jourlin-Castelli, C. (2009) Unexpected chemoreceptors mediate energy taxis towards electron acceptors in *Shewanella oneidensis*. *Mol. Microbiol.* **73**: 278–90.
- Barclay, R., McElwain, J.C., Dilcher, D., and Sageman, B. (2007) The cuticle database : developing an interactive tool for taxonomic and paleoenvironmental study of the fossil cuticle record. *Cour. Forsch. Inst. Senckenbg.* **258**: 39–55.
- Bardy, S.L., Ng, S.Y.M., and Jarell, K.F. (2003) Prokaryotic motility structures. *Microbiology* **149**: 295–304.
- Barken, K.B., Pamp, S.J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J.J., Klausen, M., et al. (2008) Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* **10**: 2331–43.
- Barrs, H.D. (1971) Cyclic variations in stomatal aperture, transpiration, and leaf water potential under constant environmental conditions. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **22**: 223–236.
- Bashan, Y., Diab, S., and Okon, Y. (1982) Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper seeds and roots in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the soil. *Plant Soil* **68**: 161–170.

- Baxter, A., Mittler, R., and Suzuki, N. (2014) ROS as key players in plant stress signalling. *J. Exp. Bot.* **65**: 1229–40.
- Beattie, G.A. (2002) Leaf surface waxes and the process of leaf colonization by microorganisms. 3-26. In *Phyllosphere microbiology*, S.E. Lindow, E.I.H.-P. and V. and Elliott, eds, (St. Paul, Minnesota), A.P. (eds).
- Beattie, G.A. (2011) Water relations in the interaction of foliar bacterial pathogens with plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **49**: 533–55.
- Beattie, G.A. and Lindow, S.E. (1999) Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology* **89**: 353–359.
- Beattie, G.A. and Lindow, S.E. (1995) The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**: 145–172.
- Becker, A., Katzen, F., Pühler, A., and Ielpi, L. (1998) Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 145–52.
- Bell, L. and Wagstaff, C. (2014) Glucosinolates, myrosinase hydrolysis products, and flavonols found in rocket (*Eruca sativa* and *Diplotaxis tenuifolia*). *J. Agric. Food Chem.* **62**: 4481–92.
- Bellostas, N., Sørensen, J.C., and Sørensen, H. (2004) Qualitative and quantitative evaluation of glucosinolates in cruciferous plants during their life cycles. *Agroindustria* **3**: 5–10.
- Bennett, J.C.Q., Thomas, J., Fraser, G.M., and Hughes, C. (2001) Substrate complexes and domain organization of the *Salmonella* flagellar export chaperones FlgN and FliT. *Mol Microbiol* **39**: 781–791.
- Beran, F., Pauchet, Y., Kunert, G., Reichelt, M., Wielsch, N., Vogel, H., et al. (2014) Phyllotreta striolata flea beetles use host plant defense compounds to create their own glucosinolate-myrosinase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 7349–54.
- Berg, H.C. (2003) The rotary motor of bacterial flagella. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 19–54.
- Bergey, D.H., Harrison, F.C., Breed, R.S., Hammer, B.W., and Huntoon, F.M. (1923) Bergey's manual of determinative bacteriology 1st Editio. C. Williams and Wilkins, ed (Baltimore). (ed).
- Blair, D.F. (2003) Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS Lett.* **545**: 86–95.
- Blair, D.F. and Berg, H.C. (1991) Mutations in the MotA protein of *Escherichia coli* reveal domains critical for proton conduction. *J. Mol. Biol.* 1433–1442.
- Blair, D.F., Kim, D.Y., and Berg, H.C. (1991) Mutant MotB proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 4049–4055.

- Blakeman, J.P. (1985) Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. In *Biological Control on the Phylloplane* ed. Windels, C.E. and Lindow, S.E. St. Paul, U.A.P.S. (ed).
- Blakeman, J.P. (1972) Effect of plant age on inhibition of *Botrytis cinerea* spores by bacteria on beetroot leaves. *Physiol. Plant Pathol.* **2**: 143–152.
- Blanvillain, S., Meyer, D., Boulanger, A., Lautier, M., Guynet, C., Denancé, N., et al. (2007) Plant carbohydrate scavenging through TonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS One* **2**: e224.
- Blažević, I. and Mastelić, J. (2009) Glucosinolate degradation products and other bound and free volatiles in the leaves and roots of radish (*Raphanus sativus* L.). *Food Chem.* **113**: 96–102.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., et al. (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* “needle complex”, a part of its type III secretion. *Mol. Microbiol.* **39**: 652–63.
- Bogdanove, A.J., Beer, S. V., Bonas, U., Boucher, C., Collmer, A., Coplin, D.L., et al. (1996) Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **20**: 681–683.
- Bogdanove, A.J., Schornack, S., and Lahaye, T. (2010) TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**: 394–401.
- Bohinc, T., Ban, G., Ban, D., and Trdan, S. (2012) Glucosinolates in plant protection strategies: A review. *Arch. Biol. Sci.* **64**: 821–828.
- Boldog, T., Grimme, S., Li, M., Sligar, S.G., and Hazelbauer, G.L. (2006) Nanodiscs separate chemoreceptor oligomeric states and reveal their signaling properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 11509–14.
- Boller, T. and Felix, G. (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**: 379–406.
- Bonas, U., Stall, R.E., and Staskawicz, B. (1989) Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.* **218**: 127–36.
- Bonifield, H.R. and Hughes, K.T. (2003) Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. *J. Bacteriol.* **185**: 3567–74.
- Bové, J.M., Renaudin, J., Saillard, C., Foissac, X., and Garnier, M. (2003) *Spiroplasma citri*, a plant pathogenic mollicute: relationships with its two hosts, the plant and the leafhopper vector. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**: 483–500.
- Boyer, J.S. (1968) Relationship of water potential to growth of leaves. *Plant Physiol.* **43**: 1056–62.

- Bradbury, J.F. (1984) Genus II *Xanthomonas* Dowson 1939. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1 (Krieg NR & Holt JG, eds), pp. 199–210. Williams and Wilkins, L. (ed).
- Bren, A. and Eisenbach, M. (2000) How signals are heard during bacterial chemotaxis: protein-protein interactions in sensory signal propagation. *J. Bacteriol.* **182**: 6865–6873.
- Bressan, M., Roncato, M.-A., Bellvert, F., Comte, G., Haichar, F.Z., Achouak, W., and Berge, O. (2009) Exogenous glucosinolate produced by *Arabidopsis thaliana* has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots. *ISME J.* **3**: 1243–57.
- Bretschneider, K.E., Gonellat, M.P., and Robeson, D.J. (1989) A comparative light and electron microscopical study of compatible and incompatible interactions between *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and cabbage (*Brassica oleracea*). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**: 285–297.
- Bridges, M., Jones, A.M.E., Bones, A.M., Hodgson, C., Cole, R., Bartlett, E., et al. (2002) Spatial organization of the glucosinolate-myrosinase system in *Brassica* specialist aphids is similar to that of the host plant. *Proc. Biol. Sci.* **269**: 187–91.
- Briegel, A., Li, X., Bilwes, A.M., Hughes, K.T., Jensen, G.J., and Crane, B.R. (2012) Bacterial chemoreceptor arrays are hexagonally packed trimers of receptor dimers networked by rings of kinase and coupling proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 3766–71.
- Briegel, A., Ortega, D.R., Tocheva, E.I., Wuichet, K., Li, Z., Chen, S., et al. (2009) Universal architecture of bacterial chemoreceptor arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 17181–6.
- Bringmann, G., Kajahn, I., Neusüss, C., Pelzing, M., Laug, S., Unger, M., and Holzgrabe, U. (2005) Analysis of the glucosinolate pattern of *Arabidopsis thaliana* seeds by capillary zone electrophoresis coupled to electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* **26**: 1513–22.
- Brisset, M.-N. and Dugé de Bernonville, T. (2011) Device for determining or studying the state of stimulation of the natural defenses of plants or portions of plants. WO/2011/161388.
- Bronstein, J.L. (1994) Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends Ecol Evol* **9**: 214–217.
- Broughton, W.J., Hern, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., and Vanderleyden, J. (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant Soil* **252**: 55–128.
- Brown, P.D., Tokuhisa, J.G., Reichelt, M., and Gershenzon, J. (2003) Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **62**: 471–81.
- Brown, P.N., Terrazas, M., Paul, K., and Blair, D.F. (2007) Mutational analysis of the flagellar protein FliG: sites of interaction with FliM and implications for organization of the switch complex. *J. Bacteriol.* **189**: 305–12.

- Buckley, T.N. (2014) The contributions of apoplastic, symplastic and gas phase pathways for water transport outside the bundle sheath in leaves. *Plant. Cell Environ.* 1–16.
- Buhtz, A., Kolasa, A., Arlt, K., Walz, C., and Kehr, J. (2004) Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. *Planta* **219**: 610–8.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E., and Schulze-Lefert, P. (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 807–38.
- Bull, C.T., Boer, S.H. De, Denny, T.P., Firrao, G., Saux, M.F., Saddler, G.S., et al. (2010) Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. Letter to the editor. *J. Plant Pathol.* **92**: 551–592.
- Bunce, J. (1996) Does transpiration control stomatal responses to water vapour pressure deficit? *Plant. Cell Environ.* **19**: 131–135.
- Burkhardt, J. (2010) Hygroscopic particles on leaves: nutrients or desiccants? *Ecol. Monogr.* **80**: 369–399.
- Burkhardt, J., Kaiser, H., Goldbach, H., and Kappen, L. (1999) Measurements of electrical leaf surface conductance reveal re-condensation of transpired water vapour on leaf surfaces. *Plant, Cell Environ.* **22**: 189–196.
- Butler, S. and Camilli, A. (2005) Going against the grain: chemotaxis and infection in *Vibrio cholerae*. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 611–620.
- Butler, S.M. and Camilli, A. (2004) Both chemotaxis and net motility greatly influence the infectivity of *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 5018–23.
- Büttner, D. (2012) Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**: 262–310.
- Büttner, D. and Bonas, U. (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**: 107–33.
- Büttner, D. and He, S.Y. (2009) Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol.* **150**: 1656–64.
- Carter, B.A., Reeder, R., Mgenzi, S.R., Kinyua, Z.M., Mbaka, J.N., Doyle, K., et al. (2010) Identification of *Xanthomonas vasicola* (formerly *X. campestris* pv. *musacearum*), causative organism of banana xanthomonas wilt, in Tanzania, Kenya and Burundi. *Plant Pathol.* **59**: 403–403.
- Casadevall, A. and Pirofski, L.-A. (2000) Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect. Immun.* **68**: 6511–6518.

- Casadevall, A. and Pirofski, L.-A. (1999) Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* **67**: 3703–3713.
- Casadevall, A. and Pirofski, L.-A. (2010) On virulence. *Virulence* **1**: 1–1.
- Castro, A., Aires, A., Rosa, E., Bloem, E., Stulen, I., and Kok, L.J. De (2004) Distribution of glucosinolates in *Brassica oleracea* cultivars. *Phyton (B. Aires)*. **44**: 133–143.
- Cesbron, S., Paulin, J.-P., Tharaud, M., Barny, M.-A., and Brisset, M.-N. (2006) The alternative sigma factor HrpL negatively modulates the flagellar system in the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* under hrp-inducing conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **257**: 221–7.
- Chan, J.W.Y.. and Goodwin, P.H. (1999a) A physical map of the chromosome of *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**: 85–90.
- Chan, J.W.Y.. and Goodwin, P.H. (1999b) The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Adv.* **17**: 489–508.
- Chang, P.-C., Wang, C.-J., You, C.-K., and Kao, M.-C. (2011) Effects of a HP0859 (*rfaD*) knockout mutation on lipopolysaccharide structure of *Helicobacter pylori* 26695 and the bacterial adhesion on AGS cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **405**: 497–502.
- Charon, N.W., Cockburn, A., Li, C., Liu, J., Miller, K.A., Miller, M.R., et al. (2012) The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**: 349–70.
- Chen, C. and Chen, Y.-R. (2007) Study on laminar hydathodes of *Ficus formosana* (Moraceae) III. Salt injury of guttation on hydathodes. *Bot. Stud.* **48**: 215–226.
- Chen, C.-C. and Chen, Y.-R. (2005) Study on laminar hydathodes of *Ficus formosana* (Moraceae) I. Morphology and ultrastructure. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **46**: 205–215.
- Chen, C.-C. and Chen, Y.-R. (2006) Study on laminar hydathodes of *Ficus formosana* (Moraceae) II. Morphogenesis of hydathodes. *Bot. Stud.* **47**: 279–292.
- Cheung, J., Bingman, C.A., Reyngold, M., Hendrickson, W.A., and Waldburger, C.D. (2008) Crystal structure of a functional dimer of the PhoQ sensor domain. *J. Biol. Chem.* **283**: 13762–70.
- Cheung, J. and Hendrickson, W. (2010) Sensor domains of two-component regulatory systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 116–123.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., and Felix, G. (2006) The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**: 465–476.
- Chun, J.-H., Arasu, M.V., Lim, Y.-P., and Kim, S.-J. (2013) Variation of major glucosinolates in different varieties and lines of rocket salad. *Hortic. Environ. Biotechnol.* **54**: 206–213.

- Clarke, C.R., Chinchilla, D., Hind, S.R., Taguchi, F., Miki, R., Ichinose, Y., et al. (2013) Allelic variation in two distinct *Pseudomonas syringae* flagellin epitopes modulates the strength of plant immune responses but not bacterial motility. *New Phytol.* **200**: 847–60.
- Conrad, J.C. (2012) Physics of bacterial near-surface motility using flagella and type IV pili: implications for biofilm formation. *Res. Microbiol.* **163**: 619–29.
- Constantinidou, H., Hirano, S.S., Baker, L., and Upper, C.D. (1990) Atmospheric dispersal of ice nucleatin-active bacteria: the role of rain. *Phytopathology* **80**: 934–937.
- Cornelis, G.R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 811–25.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., and Marrie, T.J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 435–464.
- Costerton, J.W. and Lewandowski, Z. (1995) Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 711–745.
- Cotter, S.E., Surana, N.K., and St Geme, J.W. (2005) Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* **13**: 199–205.
- Craigon, D.J., James, N., Okyere, J., Higgins, J., Jotham, J., and May, S. (2004) NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service. *Nucleic Acids Res.* **32**: D575–D577.
- Crossman, L. and Dow, J.M. (2004) Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. *Microbes Infect.* **6**: 623–9.
- Danese, P.N., Pratt, L.A., and Kolter, R. (2000) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* **182**: 3593–6.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826–833.
- Danhorn, T. and Fuqua, C. (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**: 401–22.
- Daniels, C., Godoy, P., Duque, E., Molina-Henares, M.A., de la Torre, J., Del Arco, J.M., et al. (2010) Global regulation of food supply by *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **192**: 2169–2181.
- Darrasse, A., Carrère, S., Barbe, V., Boureau, T., Arrieta-Ortiz, M.L., Bonneau, S., et al. (2013) Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads. *BMC Genomics* **14**: 761.
- Darrasse, A., Darsonval, A., Boureau, T., Brisset, M.-N., Durand, K., and Jacques, M.-A. (2010) Transmission of plant-pathogenic bacteria by nonhost seeds without induction of an associated defense reaction at emergence. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 6787–96.

- Darsonval, A., Darrasse, A., Durand, K., Bureau, C., Cesbron, S., and Jacques, M.-A. (2009) Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **22**: 747–57.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Meyer, D., Demarty, M., Durand, K., Bureau, C., et al. (2008) The Type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in the phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible beans. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 2669–78.
- Dasgupta, N., Arora, S.K., and Ramphal, R. (2000) *fleN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**: 357–64.
- Dasgupta, N., Ferrell, E.P., Kanack, K.J., West, E.H., Ramphal, R., and West, S.E.H. (2002) *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is σ 70 dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* **184**: 5240–5250.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M.C., Goodman, A.L., Arora, S.K., Jyot, J., Lory, S., and Ramphal, R. (2003) A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **50**: 809–824.
- Davis, C.L. and Brlansky, R.H. (1991) Use of immunogold labelling with scanning electron microscopy to identify phytopathogenic bacteria on leaf surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3052–3055.
- Déjean, G., Blanvillain-Baufumé, S., Boulanger, A., Darrasse, A., Dugé de Bernonville, T., Girard, A.-L., et al. (2013) The xylan utilization system of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* controls epiphytic life and reveals common features with oligotrophic bacteria and animal gut symbionts. *New Phytol.* **198**: 899–915.
- Derridj, S. (1996) Nutrients on the leave surface. In Aerial plant surface microbiology, C.E. Morris, P.C. Nicot, C. Nguyen-The, eds. (New York, Plenum Press), 25–42. (ed).
- Desvaux, M., Hébraud, M., Talon, R., and Henderson, I.R. (2009) Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.* **17**: 139–45.
- Desvaux, M., Parham, N.J., and Henderson, I.R. (2004) The autotransporter secretion system. *Res. Microbiol.* **155**: 53–60.
- Diachun, S. and Valteau, W. (1939) Relation of stomatal opening to water soaking of tobacco leaves. *AM. J. Bot.* **26**: 347–351.
- Diepold, A. and Wagner, S. (2014) Assembly of the bacterial type III secretion machinery. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**: 802–22.
- Dinant, S., Bonnemain, J.-L., Girousse, C., and Kehr, J. (2010) Phloem sap intricacy and interplay with aphid feeding. *C. R. Biol.* **333**: 504–515.

- Dinkova-Kostova, A.T. and Kostov, R. V (2012) Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol. Med.* **18**: 337–47.
- Dixon, R.A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843–7.
- Dodds, P.N. and Rathjen, J.P. (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 539–48.
- Dolphin, A.C. (2012) Calcium channel auxiliary $\alpha 2\delta$ and β subunits: trafficking and one step beyond. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**: 542–55.
- Domínguez, E., Cuartero, J., and Heredia, A. (2011) An overview on plant cuticle biomechanics. *Plant Sci.* **181**: 77–84.
- Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J.A., and Heredia, A. (2011) The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytol.* **189**: 938–49.
- Donlan, R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 881–90.
- Dow, J.M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y.-Q., Feng, J.-X., and Tang, J.-L. (2003) Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 10995–1000.
- Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L., and Zhu, G. (2013) Flagella and bacterial pathogenicity. *J. Basic Microbiol.* **53**: 1–8.
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, K., and Kaplan, I. (2013) Tansley review biosynthesis , function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol.* **198**: 16–32.
- Dufour, V., Alazzam, B., Ermel, G., Thepaut, M., Rossero, A., Tresse, O., and Baysse, C. (2012) Antimicrobial activities of isothiocyanates against *Campylobacter jejuni* isolates. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**: 53.
- Dugé de Bernonville, T., Gaucher, M., Guyot, S., Durel, C.-E., Dat, J.F., and Brisset, M.-N. (2011) The constitutive phenolic composition of two *Malus domestica* genotypes is not responsible for their contrasted susceptibilities to fire blight. *Environ. Exp. Bot.* **74**: 65–73.
- Dugé de Bernonville, T., Guyot, S., Paulin, J.-P., Gaucher, M., Loufrani, L., Henrion, D., et al. (2010) Dihydrochalcones: Implication in resistance to oxidative stress and bioactivities against advanced glycation end-products and vasoconstriction. *Phytochemistry* **71**: 443–52.
- Dugé de Bernonville, T., Noël, L.D., Sancristobal, M., Danoun, S., Becker, A., Soreau, P., et al. (2014) Transcriptional reprogramming and phenotypical changes associated with growth of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage xylem sap. *FEMS Microbiol. Ecol.* **89**: 527–541.

- Dunger, G., Relling, V.M., Tondo, M.L., Barreras, M., Ielpi, L., Orellano, E.G., and Ottado, J. (2007) Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Arch. Microbiol.* **188**: 127–35.
- Dzinic, S.H., Luercio, M., and Ram, J.L. (2008) Bacterial chemotaxis differences in *Escherichia coli* isolated from different hosts. *Can. J. Microbiol.* **54**: 1043–52.
- Elfoul, L., Rabot, S., Khelifa, N., Quinsac, A., Duguay, A., and Rimbault, A. (2001) Formation of allyl isothiocyanate from sinigrin in the digestive tract of rats monoassociated with a human colonic strain of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *FEMS Microbiol. Lett.* **197**: 99–103.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., and Turner, J.G. (2002) Constitutive activation of jasmonate signaling in an *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **15**: 1025–30.
- Enkhbayar, P., Kamiya, M., Osaki, M., Matsumoto, T., and Matsushima, N. (2004) Structural principles of Leucine-Rich Repeat (LRR) proteins. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **54**: 394–403.
- Erhardt, M., Namba, K., and Hughes, K.T. (2010) Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**: a000299.
- Espinosa, A., Guo, M., Tam, V.C., Fu, Z.Q., and Alfano, J.R. (2003) The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Mol. Microbiol.* **49**: 377–387.
- Fahey, J.W., Zalcman, A.T., and Talalay, P. (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **56**: 5–51.
- Fahn, A. (2000) Structure and function of secretory cells. In *Plant Trichomes*; Hallahan, D.L., Gray, J.C., Eds.; Academic Press: New York, NY, U.S.A. (ed).
- Fargier, E., Fischer-Le Saux, M., and Manceau, C. (2011) A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**: 156–65.
- Fargier, E. and Manceau, C. (2007) Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathol.* **56**: 805–818.
- Fenchel, T. (1994) Motility and chemosensory behaviour of the sulphur bacterium *Thiovulum majus*. *Microbiology* **140**: 3109–3116.
- Feng, X., Baumgartner, J.W., and Hazelbauer, G.L. (1997) High- and low-abundance chemoreceptors in *Escherichia coli*: differential activities associated with closely related cytoplasmic domains. *J. Bacteriol.* **179**: 6714–6720.

- Fernández, V., Sancho-Knapik, D., Guzmán, P., Peguero-Pina, J.J., Gil, L., Karabourniotis, G., et al. (2014) Wettability, polarity, and water absorption of holm oak leaves: effect of leaf side and age. *Plant Physiol.* **166**: 168–180.
- Feys, B.J. and Parker, J.E. (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet.* **16**: 449–55.
- Fiala, V., Glad, C., Martin, M., Jolivet, E., and Derridj, S. (1990) Occurrence of soluble carbohydrates on the phylloplane of maize (*Zea mays* L.): variations in relation to leaf heterogeneity and position on the plant. *New Phytol.* **115**: 609–615.
- Figueira, R. and Holden, D.W. (2012) Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology* **158**: 1147–61.
- Fitt, B., McCartney, H., and Walklate, P. (1989) The role of rain in dispersal of pathogen inoculum. *Annu. Rev. Phytopathol.* **27**: 241–270.
- Flemming, H.C. and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 623–33.
- Flor, H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**: 275–296.
- Franken, A.A.J.M. (1992) Application of polyclonal and monoclonal antibodies for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds using immunofluorescence microscopy. *Neth. J. Pl. Path* **98**: 95–106.
- Fujii, M., Shibata, S., and Aizawa, S.-I. (2008) Polar, peritrichous, and lateral flagella belong to three distinguishable flagellar families. *J. Mol. Biol.* **379**: 273–83.
- Galán, J.E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T.C., and Wagner, S. (2014) Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu. Rev. Microbiol.* **68**: 415–438.
- Gang, D.R., Wang, J., Dudareva, N., Nam, K.H., Simon, J.E., Lewinsohn, E., and Pichersky, E. (2001) An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiol.* **125**: 539–55.
- Gerlach, R.G. and Hensel, M. (2007) Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**: 401–15.
- Gestwicki, J.E. and Kiessling, L.L. (2002) Inter-receptor communication through arrays of bacterial chemoreceptors. *Nature* **415**: 81–4.
- Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J., et al. (2005) Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 733–739.
- Giday, H., Fanourakis, D., Kjaer, K.H., Fomsgaard, I.S., and Ottosen, C.-O. (2014) Threshold response of stomatal closing ability to leaf abscisic acid concentration during growth. *J. Exp. Bot.*

- Gillings, M.R., Holley, M.P., Stokes, H.W., and Holmes, A.J. (2005) Integrons in *Xanthomonas*: a source of species genome diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 4419–24.
- Glas, J.J., Schimmel, B.C.J., Alba, J.M., Escobar-Bravo, R., Schuurink, R.C., and Kant, M.R. (2012) Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *Int. J. Mol. Sci.* **13**: 17077–103.
- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**: 205–27.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.-S., Nawrath, C., Métraux, J.-P., et al. (2003) Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J.* **34**: 217–28.
- Gómez-Gómez, L. and Boller, T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* **7**: 251–256.
- Gosink, K. (2006) Signaling interactions between the aerotaxis transducer Aer and heterologous chemoreceptors in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**: 3487–3493.
- Gough, C.L., Dow, J.M., Keen, J., Henrissat, B., and Daniels, M.J. (1990) Nucleotide sequence of the *engXCA* gene encoding the major endoglucanase of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Gene* **89**: 53–59.
- Graham, J.H. (1989) Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* in soil in Citrus nurseries in Maryland and Argentina. *Plant Dis.* **73**: 423.
- Green, J., Crack, J.C., Thomson, A.J., and LeBrun, N.E. (2009) Bacterial sensors of oxygen. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**: 145–51.
- Greer-Phillips, S.E., Stephens, B.B., and Alexandre, G. (2004) An energy taxis transducer promotes root colonization by *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **186**: 6595–6604.
- Grimm, R. and Vogelsanger, J. (1990) Black rot disease on cabbage, irrigation and spreading. In: Proceedings of the 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Budapest, Hungary, June 11-16, 1989. Ukadémiai Kiao,B. (ed).
- Gudesblat, G.E., Torres, P.S., and Vojnov, A.A. (2009) *Xanthomonas campestris* overcomes *Arabidopsis* stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiol.* **149**: 1017–27.
- Gunasekera, T.S. and Paul, N.D. (2007) Ecological impact of solar ultraviolet-B (UV-B: 320–290 nm) radiation on *Corynebacterium aquaticum* and *Xanthomonas* sp. colonization on tea phyllosphere in relation to blister blight disease incidence in the field. *Lett. Appl. Microbiol.* **44**: 513–9.
- Guo, Y., Figueiredo, J.F., Jones, J., and Wang, N. (2011) HrpG, together with HrpX, play global roles in coordinating different virulence traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **24**: 649–661.

- Guy, E., Genissel, A., Hajri, A., Chabannes, M., David, P., Carrere, S., et al. (2013) Natural genetic variation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathogenicity on *Arabidopsis* revealed by association and reverse genetics. *MBio* **4**: e00538–12.
- Guzmán, M.A., Delgado, A., and De Carvalho, J. (2010) A novel multiobjective optimization algorithm based on bacterial chemotaxis. *Eng. Appl. Artif. Intell.* **23**: 292–301.
- Haiko, J. and Westerlund-Wikström, B. (2013) The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology (Basel)*. **2**: 1242–67.
- Hajri, A., Brin, C., Hunault, G., Lardeux, F., Lemaire, C., Manceau, C., et al. (2009) A “repertoire for repertoire” hypothesis: repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS One* **4**: e6632.
- Halkier, B.A. and Gershenzon, J. (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 303–33.
- Hansen, M., Laustsen, A., Olsen, C., Poll, L., and Sorensen, H. (1997) Chemical and sensory quality of broccoli (*Brassica oleracea* L. var *Italica*). *J. Food Qual.* **20**: 441–459.
- Harayama, S., Palva, E.T., and Hazelbauer, G.L. (1979) Transposon-insertion mutants of *Escherichia coli* K12 defective in a component common to galactose and ribose chemotaxis. *Mol. Gen. Genet.* **171**: 193–203.
- Hauck, P., Thilmony, R., and He, S. (2003) A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 8577–82.
- Hayward, A.C. (1993) The host of *Xanthomonas*. In: *Xanthomonas*; pp. 51–54. J.G. Swings and E.L. Civerolo (eds.); Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- Hazelbauer, G.L. (2012a) Adaptation by target remodelling. *Nature* **484**: 173–175.
- Hazelbauer, G.L. (2012b) Bacterial chemotaxis: the early years of molecular studies. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**: 285–303.
- Hazelbauer, G.L., Falke, J.J., and Parkinson, J.S. (2008) Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem. Sci.* **33**: 9–19.
- Hazelbauer, G.L. and Harayama, S. (1979) Mutants in transmission of chemotactic signals from two independent receptors of *E. coli*. *Cell* **16**: 617–625.
- He, K. and Bauer, C.E. (2014) Chemosensory signaling systems that control bacterial survival. *Trends Microbiol.* **22**: 1–10.
- He, Y.-W., Ng, A.Y.-J., Xu, M., Lin, K., Wang, L.-H., Dong, Y.-H., and Zhang, L.-H. (2007) *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. *Mol. Microbiol.* **64**: 281–92.

- He, Y.-W., Xu, M., Lin, K., Ng, A.Y.-J., Wen, C.-M., Wang, L.-H., et al. (2006) Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Mol. Microbiol.* **59**: 610–22.
- He, Y.-W. and Zhang, L.-H. (2008) Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 842–57.
- Heath, M.C. (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* **44**: 321–34.
- Heil, M. (2009) Damaged-self recognition in plant herbivore defence. *Trends Plant Sci.* **14**: 356–63.
- Henderson, I.R. and Navarro-garcia, F. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 692–744.
- Henry, J.T. and Crosson, S. (2011) Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**: 261–286.
- Hetherington, A.M. and Woodward, F.I. (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* **424**: 901–908.
- Hirano, S., Baker, L., and Upper, C. (1996) Raindrop momentum triggers growth of leaf-associated populations of *Pseudomonas syringae* on field-grown snap bean plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2560–2566.
- Hirano, S.S. and Upper, C.D. (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 624–653.
- Holmes, A.J., Holley, M.P., Mahon, A., Gillings, M., Stokes, H.W., and Nield, B. (2003) Recombination activity of a distinctive integron-gene cassette system associated with *Pseudomonas stutzeri* populations in soil. *J. Bacteriol.* **185**: 918–928.
- Homma, M. and Iino, T. (1985) Locations of hook-associated proteins in flagellar structures of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **162**: 183–9.
- Hopkins, R.J., van Dam, N.M., and van Loon, J.J.A. (2009) Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* **54**: 57–83.
- Hori, K. and Matsumoto, S. (2010) Bacterial adhesion: from mechanism to control. *Biochem. Eng. J.* **48**: 424–434.
- Hossain, M.M., Shibata, S., Aizawa, S.I., and Tsuyumu, S. (2005) Motility is an important determinant for pathogenesis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **66**: 134–143.
- Hsieh, S.P.Y. and Buddenhagen, I.W. (1974) Survival of tropical *Xanthomonas oryzae* in relation to substrate, temperature, and humidity. *Phytopathology* **65**: 513–519.

- Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q., and Xiong, L. (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 12987–12992.
- Hu, R.-M., Yang, T.-C., Yang, S.-H., and Tseng, Y.-H. (2005) Deduction of upstream sequences of *Xanthomonas campestris* flagellar genes responding to transcription activation by FleQ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335**: 1035–43.
- Huala, E., Dickerman, a W., Garcia-Hernandez, M., Weems, D., Reiser, L., LaFond, F., et al. (2001) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Res.* **29**: 102–5.
- Hugouvieux, V., Barber, C.E., and Daniels, M.J. (1998) Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **11**: 537–43.
- Hülkamp, M. and Schnittger, A. (1998) Spatial regulation of trichome formation in *Arabidopsis thaliana*. *Semin. Cell Dev. Biol.* **9**: 213–20.
- Ikeda, T., Asakura, S., and Kamiya, R. (1985) “Cap” on the tip of *Salmonella* flagella. *J. Mol. Biol.* **184**: 735–737.
- Ikeda, T., Oosawa, K., and Hotani, H. (1996) Self-assembly of the filament capping protein, FliD, of bacterial flagella into an annular structure. *J. Mol. Biol.* **259**: 679–86.
- Inaba, S., Hashimoto, M., Jyot, J., and Aizawa, S.I. (2013) Exchangeability of the flagellin (FliC) and the cap protein (FliD) among different species in flagellar assembly. *Biopolymers* **99**: 63–72.
- Indiana, A., Briand, M., Arlat, M., Gagnevin, L., Koebnik, R., Noël, L., et al. (2014) Draft genome sequence of the flagellated *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain CFBP 4884. *Genome Announc.* **2**: 4–5.
- Initiative, T.A.G. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796–815.
- Iyoda, S., Kamidoi, T., Hirose, K., Kutsukake, K., and Watanabe, H. (2001) A flagellar gene *fliZ* regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb. Pathog.* **30**: 81–90.
- Jackson, E.F., Echlin, H.L., and Jackson, C.R. (2006) Changes in the phyllosphere community of the resurrection fern, *Polypodium polypodioides*, associated with rainfall and wetting. *FEMS Microbiol. Ecol.* **58**: 236–46.
- Jackson, R.B., Carpenter, S.R., Dahm, C.N., McKnight, D.M., Naiman, R.J., Postel, S.L., and Running, S.W. (2001) Water in a changing world. *Ecol. Appl.* **11**: 1027–1045.
- Jacobs, J.L. and Sundin, G.W. (2001) Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5488–5496.

- Jacques, M., Josi, K., Darrasse, A., and Samson, R. (2005) *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2008–2015.
- Jacques, M.-A., Durand, K., Orgeur, G., Balidas, S., Fricot, C., Bonneau, S., et al. (2012) Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 8388–402.
- Jagannathan, A., Constantinidou, C., and Penn, C.W. (2001) Roles of *rpoN*, *fliA*, and *flgR* in expression of flagella in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **183**: 2937–2942.
- Jäger, R., Russwurm, C., Schwede, F., Genieser, H.-G., Koesling, D., and Russwurm, M. (2012) Activation of PDE10 and PDE11 phosphodiesterases. *J. Biol. Chem.* **287**: 1210–9.
- Jahangir, M., Abdel-Farid, I.B., Choi, Y.H., and Verpoorte, R. (2008) Metal ion-inducing metabolite accumulation in *Brassica rapa*. *J. Plant Physiol.* **165**: 1429–37.
- Jalan, N., Kumar, D., Andrade, M.O., Yu, F., Jones, J.B., Graham, J.H., et al. (2013) Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. *BMC Genomics* **14**: 551.
- Jenkins, C.L. and Starr, M.P. (1982) The brominated aryl-polyene (xanthomonadin) pigments of *Xanthomonas juglandis* protect against photobiological damage. *Curr. Microbiol.* **7**: 323–326.
- Jensen, P.E. and Leister, D. (2014) Chloroplast evolution, structure and functions. *F1000Prime Rep.* **6**: 1–14.
- Jiang, Z., Swem, L., Rushing, B., Devanathan, S., Tollin, G., and Bauer, C. (1999) Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive Yellow Protein and plant phytochromes. *Science* (80-.). **285**: 406–409.
- Jirschitzka, J., Mattern, D.J., Gershenson, J., and D’Auria, J.C. (2013) Learning from nature: new approaches to the metabolic engineering of plant defense pathways. *Curr. Opin. Biotechnol.* **24**: 320–8.
- Johansen, J. and Pinhassi, J. (2002) Variability in motility characteristics among marine bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**: 229–237.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–9.
- Josenhans, C. and Suerbaum, S. (2002) The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 605–14.
- Jubelin, G., Lanois, A., Severac, D., Rialle, S., Longin, C., Gaudriault, S., and Givaudan, A. (2013) FliZ is a global regulatory protein affecting the expression of flagellar and virulence genes in individual *Xenorhabdus nematophila* bacterial cells. *PLoS Genet.* **9**: e1003915.

- Jubelin, G., Pagès, S., Lanois, A., Boyer, M.-H., Gaudriault, S., Ferdy, J.-B., and Givaudan, A. (2011) Studies of the dynamic expression of the *Xenorhabdus* FliAZ regulon reveal atypical iron-dependent regulation of the flagellin and haemolysin genes during insect infection. *Environ. Microbiol.* **13**: 1271–84.
- Kamoun, S., Kamdar, H.V., Tola, E., and Kado, C.I. (1992) Incompatible interaction between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: role of the *hrpX* locus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 22–33.
- Karamanoli, K., Menkissoglu-Spiroudi, U., Bosabalidis, A.M., Vokou, D., and Constantinidou, H.I.A. (2005) Bacterial colonization of the phyllosphere of nineteen plant species and antimicrobial activity of their leaf secondary metabolites against leaf associated bacteria. *Chemoecology* **15**: 59–67.
- Kay, S. and Bonas, U. (2009) How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**: 37–43.
- Kazmierczak, B.I. and Hendrixson, D.R. (2013) Spatial and numerical regulation of flagellar biosynthesis in polarly flagellated bacteria. *Mol. Microbiol.* **88**: 655–63.
- Kearns, D.B. (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* **8**: 634–644.
- Kemp, B.P., Horne, J., Bryant, A., and Cooper, R.M. (2004) *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* *gumD* gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **64**: 209–218.
- Kendrick, J. and Baker, K. (1942) Bacterial blight of garden stocks and its control by hot-water seed treatment. *Calif. Agric. Exp. Stn. Bull. Bull.* **665**: 1–23.
- Kentner, D. and Sourjik, V. (2006) Spatial organization of the bacterial chemotaxis system. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 619–24.
- Key, J., Hefti, M., Purcell, E.B., and Moffat, K. (2007) Structure of the redox sensor domain of *Azotobacter vinelandii* NifL at atomic resolution: signaling, dimerization, and mechanism. *Biochemistry* **46**: 3614–3623.
- Key, J. and Moffat, K. (2005) Crystal structures of deoxy and CO-bound *bjFixLH* reveal details of ligand recognition and signaling. *Biochemistry* **44**: 4627–4635.
- Khursigara, C.M., Wu, X., and Subramaniam, S. (2008) Chemoreceptors in *Caulobacter crescentus*: trimers of receptor dimers in a partially ordered hexagonally packed array. *J. Bacteriol.* **190**: 6805–10.
- Kim, J.-G., Li, X., Roden, J.A., Taylor, K.W., Aakre, C.D., Su, B., et al. (2009) *Xanthomonas* T3S effector XopN suppresses PAMP-Triggered Immunity and interacts with a Tomato Atypical Receptor-like Kinase and TFT1. *Plant Cell* **21**: 1305–23.

- Kim, J.-G., Stork, W., and Mudgett, M.B. (2013) *Xanthomonas* type III effector XopD desumoylates tomato transcription factor SlERF4 to suppress ethylene responses and promote pathogen growth. *Cell Host Microbe* **13**: 143–54.
- Kim, K.K., Yokota, H., and Kim, S.H. (1999) Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor. *Nature* **400**: 787–92.
- Kim, S.-J., Matsuo, T., Watanabe, M., and Watanabe, Y. (2002) Effect of nitrogen and sulphur application on the glucosinolate content in vegetable turnip rape (*Brassica rapa* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* **48**: 43–49.
- Kimbrel, J.A., Givan, S.A., Temple, T.N., Johnson, K.B., and Chang, J.H. (2011) Genome sequencing and comparative analysis of the carrot bacterial blight pathogen, *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* M081, for insights into pathogenicity and applications in molecular diagnostics. *Mol. Plant Pathol.* **12**: 580–94.
- Kinkel, L.L. (1997) Microbial population dynamics on leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**: 327–47.
- Kirby, J. and Keasling, J.D. (2009) Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**: 335–55.
- Kirzinger, M.W.B. and Stavrinos, J. (2012) Host specificity determinants as a genetic continuum. *Trends Microbiol.* **20**: 88–93.
- Kishore, G.K., Pande, S., and Podile, A.R. (2005) Biological control of late leaf spot of Peanut (*Arachis hypogaea*) with chitinolytic bacteria. *Phytopathology* **95**: 1157–65.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lamberts, L., Aes-Jørgensen, A., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* **48**: 1511–1524.
- Kliebenstein, D.J. (2014) Orchestration of plant defense systems: genes to populations. *Trends Plant Sci.* **19**: 250–5.
- Kliebenstein, D.J., Kroymann, J., and Mitchell-Olds, T. (2005) The glucosinolate-myrosinase system in an ecological and evolutionary context. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 264–71.
- Koch, K., Bhushan, B., and Barthlott, W. (2008) Diversity of structure, morphology and wetting of plant surfaces. *Soft Matter* **4**: 1943–1963.
- Koebnik, R., Krüger, A., Thieme, F., Urban, A., and Bonas, U. (2006) Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. *J. Bacteriol.* **188**: 7652–60.
- Kondoh, H., Ballt, C.B., and Adler, J. (1979) Identification of a methyl-accepting chemotaxis protein for the ribose and galactose chemoreceptors of *Escherichia coli*. *PNAS* **76**: 260–264.

- Konishi, M., Kanbe, M., McMurtry, J.L., and Aizawa, S.-I. (2009) Flagellar formation in C-ring-defective mutants by overproduction of FliI, the ATPase specific for flagellar type III secretion. *J. Bacteriol.* **191**: 6186–91.
- Konkel, M.E., Klena, J.D., Rivera-Amill, V., Monteville, M.R., Biswas, D., Raphael, B., and Mickelson, J. (2004) Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J. Bacteriol.* **186**: 3296–303.
- Koshland, D.E. (1981) Biochemistry of sensing and adaptation in a simple bacterial system. *Annu. Rev. Biochem.* **50**: 765–82.
- Koshland, D.E. (1974) Chemotaxis as a model for sensory systems. *FEBS Lett.* **40**: suppl:S3–9.
- Koutsoudis, M.D., Tsaltas, D., Minogue, T.D., and von Bodman, S.B. (2006) Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 5983–8.
- Krell, T., Lacal, J., Muñoz-Martínez, F., Reyes-Darias, J.A., Cadirci, B.H., García-Fontana, C., and Ramos, J.L. (2011) Diversity at its best: bacterial taxis. *Environ. Microbiol.* **13**: 1115–24.
- Krikos, A., Conley, M.P., Boyd, A., Berg, H.C., and Simon, M.I. (1985) Chimeric chemosensory transducers of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 1326–30.
- Krul, C., Humblot, C., Philippe, C., Vermeulen, M., van Nuenen, M., Havenaar, R., and Rabot, S. (2002) Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic *in vitro* large-intestinal model. *Carcinogenesis* **23**: 1009–16.
- Kuan, T., Minsavage, G., and Schaad, N. (1986) Aerial dispersal of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from naturally infected *Brassica campestris*. *Plant Dis.* **70**: 409–413.
- Kubo, I., Muroi, H., and Kubo, A. (1995) Structural functions of antimicrobial long-chain alcohols and phenols. *Bioorg. Med. Chem.* **3**: 873–80.
- Kudlicka, K. and Brown, R.M. (1997) Cellulose and callose biosynthesis in higher plants. *Plant Physiol.* **115**: 643–656.
- Kumar, S., Vikram, S., and Raghava, G.P.S. (2013) Genome annotation of *Burkholderia* sp. SJ98 with special focus on chemotaxis genes. *PLoS One* **8**: e70624.
- Kunkel, B.N. and Brooks, D.M. (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 325–331.
- De l’agriculture et de la pêche, M. (2008) Plan écophyto 2018 de réduction des usages de pesticides 2008-2018. 1–21.

- Lacal, J., García-Fontana, C., Muñoz-Martínez, F., Ramos, J.-L., and Krell, T. (2010) Sensing of environmental signals: classification of chemoreceptors according to the size of their ligand binding regions. *Environ. Microbiol.* **12**: 2873–84.
- Lamesch, P., Berardini, T.Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., et al. (2012) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Res.* **40**: 1202–10.
- Lan, G., Schulmeister, S., Sourjik, V., and Tu, Y. (2011) Adapt locally and act globally: strategy to maintain high chemoreceptor sensitivity in complex environments. *Mol. Syst. Biol.* **7**: 475–490.
- Lannou, C. (2012) Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **50**: 319–38.
- Lanois, A., Jubelin, G., and Givaudan, A. (2008) FliZ, a flagellar regulator, is at the crossroads between motility, haemolysin expression and virulence in the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus*. *Mol. Microbiol.* **68**: 516–533.
- Leben, C. (1988) Relative humidity and the survival of epiphytic bacteria with buds and leaves of cucumber plants. *Ecol. Epidemiol.* **78**: 179–185.
- Lee, S., Ishiga, Y., Clermont, K., and Mysore, K.S. (2013) Coronatine inhibits stomatal closure and delays hypersensitive response cell death induced by nonhost bacterial pathogens. *PeerJ* **1**: e34.
- Leifson, E. (1951) Staining, shape, and arrangement of bacterial flagella. *J Bacteriol* **62**: 377–389.
- Leifson, E. and Hugh, R. (1953) Variation in shape and arrangement of bacterial flagella. *J Bacteriol Mar* **65**: 263–271.
- Lema, M., Cartea, M.E., Sotelo, T., Velasco, P., and Soengas, P. (2012) Discrimination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races among strains from northwestern Spain by *Brassica* spp. genotypes and rep-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* **133**: 159–169.
- Lemoine, R., La Camera, S., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., et al. (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front. Plant Sci.* **4**: 272.
- Lepoivre, P. (2003) *Phytopathologie Boeck.*, 1ère ed. Bruxelles: de (ed).
- Leroy, P.D., Wathelet, B., Sabri, A., Francis, F., Verheggen, F.J., Capella, Q., et al. (2011) Aphid-host plant interactions: does aphid honeydew exactly reflect the host plant amino acid composition? *Arthropod. Plant. Interact.* **5**: 193–199.
- Leveau, J.H. and Lindow, S.E. (2001) Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 3446–53.

- Leveau, J.H.. (2006) Microbial communities in the phyllosphere. In: Riederer M, Müller C (eds) *Biology of the plant cuticle*. Blackwell, O. (ed).
- Li, M. and Hazelbauer, G.L. (2004) Cellular stoichiometry of the components of the chemotaxis signaling complex. *J. Bacteriol.* **186**: 3687–3694.
- Li, R.-F., Lu, G.-T., Li, L., Su, H.-Z., Feng, G.-F., Chen, Y., et al. (2014) Identification of a putative cognate sensor kinase for the two-component response regulator HrpG, a key regulator controlling the expression of the *hrp* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Environ. Microbiol.* **16**: 2053–2071.
- Li, X. and Kushad, M.M. (2004) Correlation of glucosinolate content to myrosinase activity in horseradish (*Armoracia rusticana*). *J. Agric. Food Chem.* **52**: 6950–5.
- Liang, Y.-S., Choi, Y.H., Kim, H.K., Linthorst, H.J.M., and Verpoorte, R. (2006) Metabolomic analysis of methyl jasmonate treated *Brassica rapa* leaves by 2-dimensional NMR spectroscopy. *Phytochemistry* **67**: 2503–11.
- Lindgren, P.B. (1997) The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**: 129–52.
- Lindow, S.E. and Brandl, M.T. (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1875–1883.
- Lindow, S.E. and Leveau, J.H.. (2002) Phyllosphere microbiology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 238–243.
- Linke, D., Riess, T., Autenrieth, I.B., Lupas, A., and Kempf, V. a J. (2006) Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol.* **14**: 264–70.
- Liu, R. and Ochman, H. (2007) Stepwise formation of the bacterial flagellar system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 7116–21.
- Locsei, J.T. and Pedley, T.J. (2009) Bacterial tracking of motile algae assisted by algal cell's vorticity field. *Microb. Ecol.* **58**: 63–74.
- López-Portillo, J., Ewers, F.W., Méndez-Alonzo, R., Paredes López, C.L., Angeles, G., Alarcón Jiménez, A.L., et al. (2014) Dynamic control of osmolality and ionic composition of the xylem sap in two mangrove species. *Am. J. Bot.* **101**: 1013–1022.
- Lowe, G., Meister, M., and Berg, H.C. (1987) Rapid rotation of flagellar bundles in swimming bacteria. *Nature* **325**: 637–640.
- Ludwig-Müller, J., Schubert, B., Pieper, K., Ihmig, S., and Hilgenberg, W. (1997) Glucosinolate content in susceptible and resistant chinese cabbage varieties during development of clubroot disease. *Phytochemistry* **44**: 407–414.

- Lukasik, E. and Takken, F.L.W. (2009) STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 427–36.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., and Ton, J. (2011) Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **24**: 183–93.
- Lybarger, S.R. and Maddock, J.R. (2000) Differences in the polar clustering of the high- and low-abundance chemoreceptors of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 8057–62.
- Ma, W., Dong, F.F.T., Stavrinides, J., and Guttman, D.S. (2006) Type III effector diversification via both pathoadaptation and horizontal transfer in response to a coevolutionary arms race. *PLoS Genet.* **2**: e209.
- Ma, W. and Guttman, D.S. (2008) Evolution of prokaryotic and eukaryotic virulence effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 412–9.
- Ma, Y. and Bliss, F.A. (1978) Seed proteins of common bean. *Crop Sci.* **18**: 431–437.
- Macnab, R.M. (2003) How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 77–100.
- Maddock, J.R. and Shapiro, L. (1993) Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science* (80-.). **259**: 1717–1723.
- Magariyama, Y., Sugiyama, S., Muramoto, K., Maekawa, Y., Kawagishi, I., and Imae, Y. (1994) Very fast flagellar rotation. *Nature* **371**: 752.
- Mahuku, G.S., Jara, C., Henriquez, M.A., Castellanos, G., and Cuasquer, J. (2006) Genotypic characterization of the common bean bacterial blight pathogens, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by rep-PCR and PCR-RFLP of the ribosomal genes. *J. Phytopathol.* **154**: 35–44.
- Maiden, M.C.J. (2006) Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 561–88.
- Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., et al. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3140–3145.
- Mak, A.N.-S., Bradley, P., Bogdanove, A.J., and Stoddard, B.L. (2013) TAL effectors: function, structure, engineering and applications. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**: 93–9.
- Malamud, F., Torres, P.S., Roeschlin, R., Rigano, L.A., Enrique, R., Bonomi, H.R., et al. (2011) The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. *Microbiology* **157**: 819–29.
- Manson, M.D., Armitage, J.P., Hoch, J.A., and Macnab, R.M. (1998) Bacterial locomotion and signal transduction. *J. Bacteriol.* **180**: 1009–1022.

- Mansvelt, E.L. and Hattingh, M.J. (1987) Scanning electron microscopy of colonization of pear leaves by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Can. J. Bot.* **65**: 2517–2522.
- Mariano, R.L.R. and McCarter, S.M. (1993) Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species. *Microb Ecol* **26**: 47–58.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G., and Bonas, U. (2002) The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **15**: 637–46.
- Marolleau, B., Staub, J., Barrière, Q., Indiana, A., Gravouil, C., Chartier, R., et al. (2013) La qPFD, un outil de criblage des SDP alias stimulateurs de défense des plantes. *Phytoma* **664**: 42–45.
- Martínez, A., Torello, S., and Kolter, R. (1999) Sliding motility in mycobacteria. *J. Bacteriol.* **181**: 7331–7338.
- Mattick, J.S. (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 289–314.
- Mazar, J. and Cotter, P.A. (2006) Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol. Microbiol.* **62**: 641–54.
- McCulloch, L. (1929) A bacterial leaf spot of horse-radish caused by *Bacterium campestre* var. *armoraciae* n. var. *J. Agric. Res.* **38**: 269–287.
- McQuiston, J.R., Fields, P.I., Tauxe, R. V, and Logsdon, J.M. (2008) Do *Salmonella* carry spare tyres? *Trends Microbiol.* **16**: 142–8.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y. (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969–80.
- Meng, F., Altier, C., and Martin, G.B. (2013) *Salmonella* colonization activates the plant immune system and benefits from association with plant pathogenic bacteria. *Environ. Microbiol.* **15**: 2418–2430.
- Meng, Y., Li, Y., Galvani, C., and Hao, G. (2005) Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *J. Bacteriol.* **187**: 5560–5567.
- Mercier, J. and Lindow, S.E. (2000) Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 369–374.
- Merz, A.J., So, M., and Sheetz, M.P. (2000) Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407**: 98–102.
- Messiaen, C. (1975) The tropical vegetable garden.
- Mew, T.W. and Vera-Cruz, C.M. (1986) Epiphytic colonization of host and non-host plants by phytopathogenic bacteria. In Microbiology of the Phyllosphere ed. Fokkema, N.J. and van den Heuvel, J. pp. 269–282 Cambridge, U.C.U.P. (ed).

- Mewis, I., Ulrich, C., and Schnitzler, W.H. (2002) The role of glucosinolates and their hydrolysis products in oviposition and host-plant finding by cabbage webworm, *Hellula undalis*. *Entomol. Exp. Appl.* **105**: 129–139.
- Meyer, D.F. and Bogdanove, A.J. (2009) Genomics-driven advances. In Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology, (Jackson, ed). Norfolk, United Kingdom, C.A.P. (ed).
- Meyer, K.M. and Leveau, J.H.J. (2012) Microbiology of the phyllosphere: a playground for testing ecological concepts. *Oecologia* **168**: 621–9.
- Mhedbi-Hajri, N., Darrasse, A., Pigné, S., Durand, K., Fouteau, S., Barbe, V., et al. (2011) Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant pathogenic xanthomonads. *BMC Evol. Biol.* **11**: 67.
- Michael, T. (1994) The Bean plant. R. Hall. APS Press, Compendium of bean diseases. St Paul.
- Miles, C.I., del Campo, M.L., and Renwick, J.A.A. (2005) Behavioral and chemosensory responses to a host recognition cue by larvae of *Pieris rapae*. *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* **191**: 147–55.
- Minibayeva, F., Beckett, R.P., and Kranner, I. (2014) Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding. *Phytochemistry*.
- Mitchell, J.G., Pearson, L., Dillon, S., and Kantalis, K. (1995) Natural assemblages of marine bacteria exhibiting high-speed motility and large accelerations. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4436–40.
- Möglich, A., Ayers, R.A., and Moffat, K. (2009) Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure* **17**: 1282–1294.
- Möglich, A. and Moffat, K. (2007) Structural basis for light-dependent signaling in the dimeric LOV domain of the photosensor YtvA. *J. Mol. Biol.* **373**: 112–26.
- Moine, A., Agrebi, R., Espinosa, L., Kirby, J.R., Zusman, D.R., Mignot, T., and Mauriello, E.M.F. (2014) Functional organization of a multimodular bacterial chemosensory apparatus. *PLoS Genet.* **10**: e1004164.
- Monteiro-vitorello, C.B., Oliveira, M.C.D.E., Zerillo, M.M., Varani, A.M., and Civerolo, E. (2005) *Xylella* and *Xanthomonas* mobil'omics. *Omi. a J. Integr. Biol.* **9**: 146–159.
- Montesinos, E., Bonaterra, A., Badosa, E., Francés, J., Alemany, J., Llorente, I., and Moragrega, C. (2002) Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *Int. Microbiol.* **5**: 169–75.
- Moriya, N., Minamino, T., Hughes, K.T., Macnab, R.M., and Namba, K. (2006) The type III flagellar export specificity switch is dependent on FliK ruler and a molecular clock. *J. Mol. Biol.* **359**: 466–77.

- Moriya, N., Minamino, T., Imada, K., and Namba, K. (2011) Genetic analysis of the bacterial hook-capping protein FlgD responsible for hook assembly. *Microbiology* **157**: 1354–62.
- Morris, C.E., Monier, J., and Jacques, M.A. (1998) A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4789–4795.
- Morris, C.E., Monier, J., and Jacques, S. (1997) Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1570–1576.
- Mougel, C. and Zhulin, I.B. (2001) CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 582–4.
- Mudgett, M.B. (2005) New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 509–31.
- Mueller, M.J., Brodschelm, W., Spannagl, E., and Zenk, M.H. (1993) Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 7490–4.
- Müller, C. and Riederer, M. (2005) Plant surface properties in chemical ecology. *J. Chem. Ecol.* **31**: 2621–51.
- Murphy, G.E., Leadbetter, J.R., and Jensen, G.J. (2006) *In situ* structure of the complete *Treponema primitia* flagellar motor. *Nature* **442**: 1062–4.
- Murray, T.S. and Kazmierczak, B.I. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *J. Bacteriol.* **190**: 2700–2708.
- Mutlu, N., Vidaver, A., and Coyne, D. (2008) Differential pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains on bean genotypes with common blight resistance. *Plant Dis.* **92**: 546–554.
- Nagai, M., Ohnishi, M., Uehara, T., Yamagami, M., Miura, E., Kamakura, M., et al. (2013) Ion gradients in xylem exudate and guttation fluid related to tissue ion levels along primary leaves of barley. *Plant. Cell Environ.* **36**: 1826–37.
- Naito, K., Ishiga, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y. (2007) N-terminal domain including conserved flg22 is required for flagellin-induced hypersensitive cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J. Gen. Plant Pathol.* **73**: 281–285.
- Nan, B., Bandaria, J.N., Moghtaderi, A., Sun, I., Yildiz, A., and Zusman, D.R. (2013) Flagella stator homologs function as motors for myxobacterial gliding motility by moving in helical trajectories. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: 1508–1513.
- Nan, B. and Zusman, D.R. (2011) Uncovering the mystery of gliding motility in the myxobacteria. *Annu. Rev. Genet.* **45**: 21–39.

- Naoumkina, M., Zhao, Q., Gallego-Giraldo, L., Dai, X., Zhao, P.X., and Dixon, R.A. (2010) Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Mol. Plant Pathol.* **11**: 829–846.
- Negi, J., Hashimoto-Sugimoto, M., Kusumi, K., and Iba, K. (2014) New approaches to the biology of stomatal guard cells. *Plant Cell Physiol.* **55**: 241–50.
- Newman, K.L., Almeida, R.P.P., Alexander, H., Lindow, S.E., and Purcell, A.H. (2003) Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7319–7327.
- Newman, M.-A., Sundelin, T., Nielsen, J.T., and Erbs, G. (2013) MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front. Plant Sci.* **4**: 139.
- Niño, M., Kim, J., Lee, H.J., Abdula, S.E., Nou, I.S., and Cho, Y.-G. (2014) Key roles of cysteine protease in different plant pathosystem. *Plant Breed. Biotechnol.* **2**: 97–109.
- Nishiyama, S., Suzuki, D., Itoh, Y., Suzuki, K., Tajima, H., Hyakutake, A., et al. (2012) Mlp24 (McpX) of *Vibrio cholerae* implicated in pathogenicity functions as a chemoreceptor for multiple amino acids. *Infect. Immun.* **80**: 3170–8.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D., and Bonas, U. (2001) cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Microbiol.* **41**: 1271–81.
- O’Carrigan, A., Hinde, E., Lu, N., Xu, X.-Q., Duan, H., Huang, G., et al. (2014) Effects of light irradiance on stomatal regulation and growth of tomato. *Environ. Exp. Bot.* **98**: 65–73.
- O’Connell, A., An, S.-Q., McCarthy, Y., Schulte, F., Niehaus, K., He, Y.-Q., et al. (2013) Proteomics analysis of the regulatory role of Rpf/DSF cell-to-cell signaling system in the virulence of *Xanthomonas campestris*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **26**: 1131–7.
- O’toole, J.C. and Cruz, R.T. (1980) Response of leaf water potential, stomatal resistance, and leaf rolling to water stress. *Plant Physiol.* **65**: 428–32.
- Oh, I., Park, A., Bae, M., and Kwon, S. (2005) Secretome analysis reveals an *Arabidopsis* lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *Plant Cell* **17**: 2832–2847.
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H., and Iino, T. (1990) Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 139–47.
- Ohnishi, K., Ohto, Y., Aizawa, S., Macnab, R.M., and Iino, T. (1994) FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**: 2272–81.
- Olsen, J.E., Hoegh-Andersen, K.H., Casadesús, J., Rosenkranzt, J., Chadfield, M.S., and Thomsen, L.E. (2013) The role of flagella and chemotaxis genes in host pathogen interaction of the host adapted *Salmonella enterica* serovar Dublin compared to the broad host range serovar *S. Typhimurium*. *BMC Microbiol.* **13**: 67.

- Olsen, K.N., Budde, B.B., Siegumfeldt, H., Bjo, K., Tta, C.T.T., Gta, T.T.T., et al. (2002) Noninvasive measurement of bacterial intracellular pH on a single-cell level with green fluorescent protein and fluorescence ratio imaging microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4145–4147.
- Ottemann, K. and Lowenthal, A. (2002) *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect. Immun.* **70**: 1984–1990.
- Paranjpye, R.N. and Strom, M.S. (2005) A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contributes to biofilm formation, adherence to epithelial cells, and virulence. *Infect. Immun.* **73**: 1411–1422.
- Parkinson, J.S., Ames, P., and Studdert, C.A. (2005) Collaborative signaling by bacterial chemoreceptors. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 116–21.
- Pate, J.S. and Gunning, B.E.S. (1972) Transfer cells. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **23**: 173–196.
- Payne, W.W., Galsley, J.D., Bowles, M.L., Brunken, J.N., Engle, L.M., Guhardja, E., et al. (1978) A glossary of plant hair terminology. *Brittonia* **30**: 239–255.
- Pellequer, J., Wager-Smith, K.A., Kay, S.A., and Getzoff, E.D. (1998) Photoactive yellow protein: A structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 5884–5890.
- Peñuelas, J. and Terradas, J. (2014) The foliar microbiome. *Trends Plant Sci.* **19**: 278–80.
- Pham, H.T. and Parkinson, J.S. (2011) Phenol sensing by *Escherichia coli* chemoreceptors: a nonclassical mechanism. *J. Bacteriol.* **193**: 6597–604.
- Pieretti, I., Royer, M., Barbe, V., Carrere, S., Koebnik, R., Cociancich, S., et al. (2009) The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. *BMC Genomics* **10**: 616.
- Pieretti, I., Royer, M., Barbe, V., Carrere, S., Koebnik, R., Couloux, A., et al. (2012) Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. *BMC Genomics* **13**: 658.
- Pieterse, C. and van Loon, L. (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* **4**: 52–58.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C.M. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 308–16.
- Pietrarelli, L., Balestra, G.M., and Varvaro, L. (2006) Effects of simulated rain on *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* populations on tomato plants. *J. Plant Pathol.* **88**: 245–251.
- Ping, L. (2012) Cell orientation of swimming bacteria: from theoretical simulation to experimental evaluation. *Sci. China. Life Sci.* **55**: 202–9.

- PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), E. (2014a) Scientific Opinion on the pest categorisation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *EFSA J.* **12**: 3856.
- PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), E. (2014b) Scientific Opinion on the pest categorisation of *Xanthomonas campestris*. *EFSA J.* **12**: 3720.
- Ponting, C.P. and Aravind, L. (1997) PAS : a multifunctional domain family comes to light. *Curr. Biol.* **7**: 674–677.
- Poplawsky, A.R., Urban, S.C., and Chun, W. (2000) Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5123–7.
- Porter, S.L., Wadhams, G.H., and Armitage, J.P. (2011) Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 153–65.
- Pratt, L. a and Kolter, R. (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* **30**: 285–93.
- Preston, G.M., Studholme, D.J., and Caldelari, I. (2005) Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 331–60.
- Prüss, B.M., Besemann, C., Denton, A., and Wolfe, A.J. (2006) A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**: 3731–9.
- Pruvost, O., Savelon, C., Boyer, C., Chiroleu, F., Gagnevin, L., and Jacques, M.-A. (2009) Populations of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* from asymptomatic mango leaves are primarily endophytic. *Microb. Ecol.* **58**: 170–8.
- Rademaker, J.L., Hoste, B., Louws, F.J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., et al. (2000) Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 665–77.
- Rademaker, J.L.W., Louws, F.J., Schultz, M.H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J., and de Bruijn, F.J. (2005) A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology* **95**: 1098–111.
- Rai, R., Ranjan, M., Pradhan, B.B., and Chatterjee, S. (2012) Atypical regulation of virulence associated functions by a Diffusible Signal Factor in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. plant-microbe Interact.* **25**: 789–801.
- Rajagopal, L., Sundari, C.S., Balasubramanian, D., and Sonti, R. V. (1997) The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. *FEBS Lett.* **415**: 125–128.
- Ramirez, A.M., Stoop, G., Menzel, T.R., Gols, R., Bouwmeester, H.J., Dicke, M., and Jongsma, M.A. (2012) Bidirectional secretions from glandular trichomes of pyrethrum enable immunization of seedlings. *Plant Cell* **24**: 4252–65.

- Rangkadilok, N., Nicolas, M.E., Bennett, R.N., Premier, R.R., Eagling, D.R., and Taylor, P.W.. (2002) Developmental changes of sinigrin and glucoraphanin in three *Brassica* species (*Brassica nigra*, *Brassica juncea* and *Brassica oleracea* var. *italica*). *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **96**: 11–26.
- Rastogi, G., Coaker, G.L., and Leveau, J.H.J. (2013) New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. *FEMS Microbiol. Lett.* **348**: 1–10.
- Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, a, Kähkönen, M., Kujala, T., et al. (2000) Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol.* **56**: 3–12.
- Raven, P., Evert, R., and Eichhorn, S. (2007) Biologie végétale. Edition, E.D. boeck 2eme (ed).
- Redford, A.J., Bowers, R.M., Knight, R., Linhart, Y., and Fierer, N. (2010) The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environ. Microbiol.* **12**: 2885–93.
- Redovniković, I.R., Glivetić, T., Delonga, K., and Vorkapic-Furac, J. (2008) Glucosinolates and their potential role in plant. *Period. Biol.* **110**: 297–309.
- Reinelt, S., Hofmann, E., Gerharz, T., Bott, M., and Madden, D.R. (2003) The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular PAS domain. *J. Biol. Chem.* **278**: 39189–96.
- Remus-Emsermann, M.N.P., Lückner, S., Müller, D.B., Potthoff, E., Daims, H., and Vorholt, J.A. (2014) Spatial distribution analyses of natural phyllosphere-colonizing bacteria on *Arabidopsis thaliana* revealed by fluorescence in situ hybridization. *Environ. Microbiol.* **16**: 2329–40.
- Renger, G. (2010) The light reactions of photosynthesis. *Curr. Sci.* **98**: 1305–1319.
- Reuter, M. and van Vliet, A.H.M. (2013) Signal balancing by the CetABC and CetZ chemoreceptors controls energy taxis in *Campylobacter jejuni*. *PLoS One* **8**: e54390.
- Rhee, S.Y., Beavis, W., Berardini, T.Z., Chen, G., Dixon, D., Doyle, A., et al. (2003) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a model organism database providing a centralized, curated gateway to *Arabidopsis* biology, research materials and community. *Nucleic Acids Res.* **31**: 224–228.
- Richardson, K. (1991) Roles of motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae*: analysis of motility mutants in three animal models. *Infect. Immun.* **59**: 2727–36.
- Riederer, M. (2006) Thermodynamics of the water permeability of plant cuticles: characterization of the polar pathway. *J. Exp. Bot.* **57**: 2937–42.

- Rivera-Chávez, F., Winter, S.E., Lopez, C.A., Xavier, M.N., Winter, M.G., Nuccio, S.-P., et al. (2013) *Salmonella* uses energy taxis to benefit from intestinal inflammation. *PLoS Pathog.* **9**: e1003267.
- Rodriguez-R, L.M., Grajales, A., Arrieta-Ortiz, M., Salazar, C., Restrepo, S., and Bernal, A. (2012) Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. *BMC Microbiol.* **12**: 43.
- Rong, W., Feng, F., Zhou, J., and He, C. (2010) Effector-triggered innate immunity contributes *Arabidopsis* resistance to *Xanthomonas campestris*. *Mol. Plant Pathol.* **11**: 783–93.
- Roper, M.C., Greve, L.C., Labavitch, J.M., and Kirkpatrick, B.C. (2007) Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* *in vitro* and *in planta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 7252–7258.
- Rosa, E. and Rodrigues, A. (2001) Total and individual glucosinolate content in 11 broccoli cultivars grown in early and late seasons. *HortScience* **36**: 56–59.
- Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., et al. (2011) The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell* **23**: 2440–55.
- Rowe-Magnus, D.A. and Mazel, D. (2002) The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**: 115–25.
- Ruissen, M. and Gielink, A. (1994) The development of black rot in cabbage as a result of differences in guttation between cultivars, and the relation of guttation to infectiousness. *Colloq. - INRA Proc. 8th Int. Conf. Plant Pathog. Bact.* **66**: 764–774.
- Ruppel, S., Krumbein, A., and Schreiner, M. (2008) Composition of the phyllospheric microbial populations on vegetable plants with different glucosinolate and carotenoid compositions. *Microb. Ecol.* **56**: 364–72.
- Ryan, R.P. and Dow, J.M. (2008) Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology* **154**: 1845–58.
- Ryan, R.P. and Dow, J.M. (2010) Intermolecular interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence-related signal transduction in *Xanthomonas campestris*. *Virulence* **1**: 404–8.
- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Crossman, L.C., Spiro, S., He, Y.-W., et al. (2006) Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 6712–7.
- Ryan, R.P., McCarthy, Y., Andrade, M., Farah, C.S., Armitage, J.P., and Dow, J.M. (2010) Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 5989–94.

- Ryan, R.P., Vorhölter, F.-J., Potnis, N., Jones, J.B., Van Sluys, M.-A., Bogdanove, A.J., and Dow, J.M. (2011) Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 344–55.
- Sabri, A., Vandermoten, S., Leroy, P.D., Haubruge, E., Hance, T., Thonart, P., et al. (2013) Proteomic investigation of aphid honeydew reveals an unexpected diversity of proteins. *PLoS One* **8**: e74656.
- Saddler, G.S. and Bradbury, J.F. (2005) Family I. *Xanthomonadaceae* fam. nov. In Bergey's manual of systematic bacteriology second edition, vol. 2 (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria), (Garrrity, G.M, Brenner, D.J, Krieg, N.R and Staley, J.T eds) Springer, New York, 63-90. (ed).
- Sallet, E., Gouzy, J., and Schiex, T. (2014) EuGene-PP: a next-generation automated annotation pipeline for prokaryotic genomes. *Bioinformatics* **30**: 2659–61.
- Sallets, A., Beyaert, M., Boutry, M., and Champagne, A. (2014) Comparative proteomics of short and tall glandular trichomes of *Nicotiana tabacum* reveals differential metabolic activities. *J. Proteome Res.* **13**: 3386–96.
- Salzer, R., Joos, F., and Averhoff, B. (2014) Type IV pilus biogenesis, twitching motility, and DNA uptake in *Thermus thermophilus*: discrete roles of antagonistic ATPases PilF, PilT1, and PilT2. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 644–52.
- Salzman, R., Brady, J., Finlayson, S.A., Buchanan, C.D., Summer, E.J., Sun, F., et al. (2005) Transcriptional profiling of sorghum induced by methyl jasmonate, salicylic acid, and aminocyclopropane carboxylic acid reveals cooperative regulation and novel gene responses. *Plant Physiol.* **138**: 352–368.
- Savchenko, T., Kolla, V.A., Wang, C.Q., Nasafi, Z., Hicks, D.R., Phadungchob, B., et al. (2014) Functional convergence of oxylipin and abscisic acid pathways controls stomatal closure in response to drought. *Plant Physiol.* **164**: 1151–60.
- Schaad, N.W. and Dianese, J.C. (1981) Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot crucifers. *Phytopathology* **71**: 1215–1220.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., et al. (2006) Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**: 690–5.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., et al. (2005) Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**: 494–518.
- Schilmiller, A.L., Last, R.L., and Pichersky, E. (2008) Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *Plant J.* **54**: 702–11.

- Schmera, D. and Guerin, P.M. (2012) Plant volatile compounds shorten reaction time and enhance attraction of the codling moth (*Cydia pomonella*) to codlemone. *Pest Manag. Sci.* **68**: 454–461.
- Scholl, R.L., May, S.T., and Ware, D.H. (2000) Seed and molecular resources for *Arabidopsis*. *Ressources Oppor.* **124**: 1477–1480.
- Scholze, H. and Boch, J. (2011) TAL effectors are remote controls for gene activation. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**: 47–53.
- Schultz, T. and Gabrielson, R.L. (1986) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in western washington cricifer seed fields: occurrence and survival. *Ecol. Epidemiol.* **76**: 1306–1309.
- Schweinitzer, T. and Josenhans, C. (2010) Bacterial energy taxis: a global strategy? *Arch. Microbiol.* **192**: 507–20.
- Segonzac, C. and Zipfel, C. (2011) Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**: 54–61.
- Shelton, A. and Hunter, J. (1985) Evaluation of the potential of the flea beetle *Phyllotreta cruciferae* to transmit *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, causal agent of black rot of crucifers. *Can. J. Plant Pathol.* **7**: 308–310.
- Shepherd, R.W. and Wagner, G.J. (2007) Phylloplane proteins: emerging defenses at the aerial frontline? *Trends Plant Sci.* **12**: 51–6.
- Shi, W. and Sun, H. (2002) Type IV pilus-dependent motility and its possible role in bacterial pathogenesis. *Infect. Immun.* **70**: 1–4.
- Shigaki, T., Nelson, S., and Alvarez, A. (2000) Symptomless spread of blight-inducing strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage seedlings in misted seedbeds. *Eur. J. plant Pathol.* **106**: 339–346.
- Shitashiro, M., Kato, J., Fukumura, T., Kuroda, A., Ikeda, T., Takiguchi, N., and Ohtake, H. (2003) Evaluation of bacterial aerotaxis for its potential use in detecting the toxicity of chemicals to microorganisms. *J. Biotechnol.* **101**: 11–18.
- Da Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., et al. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**: 459–63.
- Da Silva Neto, J.F., Koide, T., Gomes, S.L., and Marques, M. V (2007) The single extracytoplasmic-function sigma factor of *Xylella fastidiosa* is involved in the heat shock response and presents an unusual regulatory mechanism. *J. Bacteriol.* **189**: 551–60.
- Silverstein, K., Graham, M., Paape, T.D., and VandenBosch, K.A. (2005) Genome organization of more than 300 defensin-like genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **138**: 600–610.
- Singh, S. (2001) Broadening the genetic base of common bean cultivars. *Crop Sci.* **41**: 1659–1675.

- Singh, S. and Singh, T.N. (2013) Guttation 1: chemistry, crop husbandry and molecular farming. *Phytochem. Rev.* **12**: 147–172.
- Sirinutsomboon, B., Delwiche, M.J., and Young, G.M. (2011) Attachment of *Escherichia coli* on plant surface structures built by microfabrication. *Biosyst. Eng.* **108**: 244–252.
- Sisti, F., Ha, D.-G., O'Toole, G.A., Hozbor, D., and Fernández, J. (2013) Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology* **159**: 869–79.
- Skerker, J.M. and Berg, H.C. (2001) Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 6901–4.
- Slater, H., Alvarez-Morales, A., Barber, C.E., Daniels, M.J., and Dow, J.M. (2000) A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol. Microbiol.* **38**: 986–1003.
- Smith, T.G. and Hoover, T.R. (2009) Deciphering bacterial flagellar gene regulatory networks in the genomic era. *Adv. Appl. Microbiol.* **67**: 257–95.
- Sourjik, V. (2004) Receptor clustering and signal processing in *E. coli* chemotaxis. *Trends Microbiol.* **12**: 569–76.
- Sourjik, V. and Berg, H.C. (2000) Localization of components of the chemotaxis machinery of *Escherichia coli* using fluorescent protein fusions. *Mol. Microbiol.* **37**: 740–51.
- Soutourina, O. a and Bertin, P.N. (2003) Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 505–523.
- Sowa, Y. and Berry, R.M. (2008) Bacterial flagellar motor. *Q. Rev. Biophys.* **41**: 103–32.
- Stadler, B. and Müller, T. (2000) Effects of aphids and moth caterpillars on epiphytic microorganisms in canopies of forest trees. *Can. J. For. Res.* **30**: 631–638.
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., and Ploy, M.-C. (2012) Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* **3**: 119.
- Staub, T. and Williams, P.H. (1972) Factor influencing black rot lesion development in resistant and susceptible cabbage. *Phytopathology* **62**: 722–728.
- Steudle, E. and Frensch, J. (1996) Water transport in plants: role of the apoplast. *Plant Soil* **187**: 67–79.
- Stewart, V. (2014) The HAMP signal-conversion domain: static two-state or dynamic three-state? *Mol. Microbiol.* 1–5.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 187–209.

- Stuart, L.M., Paquette, N., and Boyer, L. (2013) Effector-triggered versus pattern-triggered immunity: how animals sense pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **13**: 199–206.
- Studdert, C.A. and Parkinson, J.S. (2004) Crosslinking snapshots of bacterial chemoreceptor squads. *PNAS* **101**: 2117–2122.
- Sturm, A., Van Kuik, J.A., Vliegenthart, J.F.G., and Chrispeels, M.J. (1987) Structure, position, and biosynthesis of the high mannose and the complex oligosaccharide side chains of the bean storage protein phaseolin. *J. Biol. Chem.* **262**: 13392–13403.
- Sun, W., Dunning, F., and Pfund, C. (2006) Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and its impact on elicitation of *Arabidopsis* FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *Plant Cell* **18**: 764–79.
- Sundin, G.W. and Jacobs, J.L. (1999) Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Microb. Ecol.* **38**: 27–38.
- Swings, J. and Civerolo, E.L. (1993) *Xanthomonas* Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, L.S. 8HN (ed).
- Swings, J., Vauterin, L., and Kersters, K. (1993) The bacterium *Xanthomonas* In Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, L.S. 8HN (ed).
- Szurmant, H. and Ordal, G.W. (2004) Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 301–319.
- Tan, S., Yang, C., Mei, X., Shen, S., Raza, W., Shen, Q., and Xu, Y. (2013) The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. *Appl. Soil Ecol.* **64**: 15–22.
- Tang, J., Gough, C., and Daniels, M. (1990) Cloning of genes involved in negative regulation of production of extracellular enzymes and polysaccharide of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol. Gen. Genet. MGG* **222**: 157–160.
- Tao, F., Swarup, S., and Zhang, L.-H. (2010) Quorum sensing modulation of a putative glycosyltransferase gene cluster essential for *Xanthomonas campestris* biofilm formation. *Environ. Microbiol.* **12**: 3159–70.
- Tao, J. and He, C. (2010) Response regulator, VemR, positively regulates the virulence and adaptation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *FEMS Microbiol. Lett.* **304**: 20–28.
- Taylor, B.L. (2007) Aer on the inside looking out: paradigm for a PAS-HAMP role in sensing oxygen, redox and energy. *Mol. Microbiol.* **65**: 1415–24.
- Taylor, B.L. and Zhulin, I.B. (1999) PAS domains : internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 479–506.

- Taylor, K.W., Kim, J.-G., Su, X.B., Aakre, C.D., Roden, J.A., Adams, C.M., and Mudgett, M.B. (2012) Tomato TFT1 is required for PAMP-Triggered Immunity and mutations that prevent T3S effector XopN from binding to TFT1 attenuate *Xanthomonas* virulence. *PLoS Pathog.* **8**: e1002768.
- Taylor, S.H., Parker, W.E., and Douglas, A.E. (2012) Patterns in aphid honeydew production parallel diurnal shifts in phloem sap composition. *Entomol. Exp. Appl.* **142**: 121–129.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Büttner, D., et al. (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome. *J. Bacteriol.* **187**: 7254–7266.
- Thomma, B.P.H.J., Nürnberger, T., and Joosten, M.H.A.J. (2011) Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* **23**: 4–15.
- Thordal-Christensen, H. (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 351–357.
- Thormann, K.M. and Paulick, A. (2010) Tuning the flagellar motor. *Microbiology* **156**: 1275–83.
- Thowthampitak, J., Shaffer, B.T., Prathuangwong, S., and Loper, J.E. (2008) Role of *rpfF* in virulence and exoenzyme production of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, the causal agent of bacterial pustule of soybean. *Phytopathology* **98**: 1252–60.
- Tian, F., Yu, C., Li, H., Wu, X., Li, B., Chen, H., et al. (2014) Alternative sigma factor RpoN2 is required for flagellar motility and full virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Microbiol. Res.* **191**: 2266–2275.
- Tierens, K.F., Thomma, B.P., Brouwer, M., Schmidt, J., Kistner, K., Porzel, A., et al. (2001) Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. *Plant Physiol.* **125**: 1688–99.
- Timmis, R. (2002) *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ. Microbiol.* **4**: 779–781.
- Tissier, A. (2012) Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? *Plant J.* **70**: 51–68.
- Troisfontaines, P. and Cornelis, G.R. (2005) Type III secretion: more systems than you think. *Physiology* **20**: 326–339.
- Tseng, T.-T., Tyler, B.M., and Setubal, J.C. (2009) Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* **9 Suppl 1**: S2.
- Tukey, H.B. (1970) The leaching of substances from plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **21**: 305–324.

- Turgeon, R. (1989) The sink-source transition in leaves. *Annu. rev. plant physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 119–138.
- Turner, T.R., James, E.K., and Poole, P.S. (2013) The plant microbiome. *Genome Biol.* **14**: 209.
- Tyson, G., Stojanovic, B., Kuklinski, R., DiVittorio, T., and Sullivan, M. (1985) Scanning electron microscopy of Pierce's disease bacterium in petiolar xylem of grape leaves. *Phytopathology* **75**: 264–269.
- Ulrich, L.E. and Zhulin, I.B. (2005) Four-helix bundle: a ubiquitous sensory module in prokaryotic signal transduction. *Bioinformatics* **45**: 45–48.
- Umemura, T., Matsumoto, Y., Ohnishi, K., Homma, M., and Kawagishi, I. (2002) Sensing of cytoplasmic pH by bacterial chemoreceptors involves the linker region that connects the membrane-spanning and the signal-modulating helices. *J. Biol. Chem.* **277**: 1593–8.
- Underwood, W., Melotto, M., and He, S.Y. (2007) Role of plant stomata in bacterial invasion. *Cell. Microbiol.* **9**: 1621–9.
- Valls, M., Genin, S., and Boucher, C. (2006) Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog.* **2**: e82.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 472–489.
- Vauterin, L., Rademaker, J., and Swings, J. (2000) Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology* **90**: 677–82.
- Vauterin, L. and Swings, J. (1997) Are classification and phytopathological diversity compatible in *Xanthomonas*? *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 77–82.
- Vauterin, L., Yang, P., Alvarez, A., Takikawa, Y., Roth, D.A., Vidaver, A.K., et al. (1996) Identification of non-pathogenic *Xanthomonas* strains associated with plants. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**: 96–105.
- Velasco, P. and Soengas, P. (2008) Comparison of glucosinolate profiles in leaf and seed tissues of different *Brassica napus* crops. *J. Amer. Soc. hort. Sci* **133**: 551–558.
- Verdier, V., Triplett, L.R., Hummel, A.W., Corral, R., Cernadas, R.A., Schmidt, C.L., et al. (2012) Transcription activator-like (TAL) effectors targeting OsSWEET genes enhance virulence on diverse rice (*Oryza sativa*) varieties when expressed individually in a TAL effector-deficient strain of *Xanthomonas oryzae*. *New Phytol.* **196**: 1197–207.
- Vicente, J.G., Everett, B., and Roberts, S.J. (2006) Identification of isolates that cause a leaf spot disease of *Brassicaceae* as *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* and pathogenic and genetic comparison with related pathovars. *Phytopathology* **96**: 735–45.
- Vicente, J.G. and Holub, E.B. (2012) Pathogen profile *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Mol. Plant Pathol.* **14**: 2–18.

- Vidaver, A.K. (1993) *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: cause of common bacterial blight. In J. G. Swings and E. L. Civerolo (ed.), *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London, U.K. (ed).
- Vladimirov, N., Lebiedz, D., and Sourjik, V. (2010) Predicted auxiliary navigation mechanism of peritrichously flagellated chemotactic bacteria. *PLoS Comput. Biol.* **6**: e1000717.
- Vladimirov, N. and Sourjik, V. (2009) Chemotaxis: how bacteria use memory. *Biol. Chem.* **390**: 1097–104.
- Vonderviszt, F. and Namba, K. (2000) Structure, function and assembly of flagellar axial proteins. Thomas Sch. Bioscience., T.S.L. (ed).
- Vorholt, J.A. (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 828–40.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J., and Ivanova, E.P. (2009) Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* **14**: 2535–54.
- Wadhams, G.H. and Armitage, J.P. (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 1024–37.
- Wadhams, G.H., Martin, A.C., and Armitage, J.P. (2000) Identification and localization of a methyl-accepting chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **36**: 1222–33.
- Wadhams, G.H., Martin, A.C., Porter, S.L., Maddock, J.R., Mantotta, J.C., King, H.M., and Armitage, J.P. (2002) TlpC, a novel chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*, localizes to a discrete region in the cytoplasm. *Mol. Microbiol.* **46**: 1211–21.
- Wadhams, G.H., Warren, A. V., Martin, A.C., and Armitage, J.P. (2003) Targeting of two signal transduction pathways to different regions of the bacterial cell. *Mol. Microbiol.* **50**: 763–770.
- Wagner, G.J. (1991) Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiol.* **96**: 675–9.
- Wakker, J.H. (1883) Vorläufige Mittheilungen über Hyacinthenkrankheiten. *Bot. Cent.* 315–317.
- Wall, D. and Kaiser, D. (1999) Type IV pili and cell motility. *Mol. Microbiol.* **32**: 1–10.
- Wang, F.-F., Wang, L., and Qian, W. (2010) Two-component signal transduction systems and regulation of virulence factors in *Xanthomonas*: a perspective. *Front. Biol. (Beijing)*. **5**: 495–506.
- Wang, H., Robinson, H., and Ke, H. (2010) Conformation changes, N-terminal involvement, and cGMP signal relay in the phosphodiesterase-5 GAF domain. *J. Biol. Chem.* **285**: 38149–56.

- Wang, W., Xu, B., Wang, H., Li, J., Huang, H., and Xu, L. (2011) YUCCA genes are expressed in response to leaf adaxial-abaxial juxtaposition and are required for leaf margin development. *Plant Physiol.* **157**: 1805–19.
- Wang, Z.Y., Xiong, L., Li, W., Zhu, J.K., and Zhu, J. (2011) The plant cuticle is required for osmotic stress regulation of abscisic acid biosynthesis and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 1971–84.
- Wangs, E.A., Mowry, K.L., Clegg, D.O., and Koshland, D.E.J. (1982) Tandem duplication and multiple functions of a receptor gene in bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **257**: 4673–4676.
- Waterman, S.R. and Holden, D.W. (2003) Microreview Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell. Microbiol.* **5**: 501–511.
- Watts, K.J., Johnson, M.S., and Taylor, B.L. (2011) Different conformations of the kinase-on and kinase-off signaling states in the Aer HAMP domain. *J. Bacteriol.* **193**: 4095–103.
- Weerasuriya, S., Schneider, B.M., and Manson, M.D. (1998) Chimeric chemoreceptors in *Escherichia coli* : signaling properties of Tar-Tap and Tap-Tar hybrids. *J. Bacteriol.* **180**: 914–920.
- De Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I.H.M., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G.V., et al. (2002) Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **15**: 1173–80.
- Wei, J., van Loon, J.J. a, Gols, R., Menzel, T.R., Li, N., Kang, L., and Dicke, M. (2014) Reciprocal crosstalk between jasmonate and salicylate defence-signalling pathways modulates plant volatile emission and herbivore host-selection behaviour. *J. Exp. Bot.* **65**: 3289–98.
- Wei, K., Tang, D.-J., He, Y.-Q., Feng, J.-X., Jiang, B.-L., Lu, G.-T., et al. (2007) *hpaR*, a putative *marR* family transcriptional regulator, is positively controlled by HrpG and HrpX and involved in the pathogenesis, hypersensitive response, and extracellular protease production of *Xanthomonas campestris* pathovar *c*. *J. Bacteriol.* **189**: 2055–62.
- Weibull, J., Ronquist, F., and Brishammar, S. (1990) Free amino acid composition of leaf exudates and Phloem sap. *Plant Physiol.* **92**: 222–6.
- Wengelnik, K., Van den Ackerveken, G., and Bonas, U. (1996) HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 704–712.
- Whipps, J.M., Hand, P., Pink, D., and Bending, G.D. (2008) Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J. Appl. Microbiol.* **105**: 1744–55.
- White, F.F., Potnis, N., Jones, J.B., and Koebnik, R. (2009) The type III effectors of *Xanthomonas*. *Mol. Plant Pathol.* **10**: 749–66.

- White, H.E. (1930) Bacterial spot of radish and turnip. *Phytopathology* **20**: 653–662.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6578–6583.
- Wilharm, G., Lehmann, V., and Krauss, K. (2004) *Yersinia enterocolitica* type III secretion depends on the proton motive force but not on the flagellar motor components MotA and MotB. *Infect. Immun.* **72**: 4004–4009.
- Williams, P.H. (1980) Black rot: a continuing threat to world crucifers. *Plant Dis.* **64**: 736–742.
- Woodring, J., Wiedemann, R., Fischer, M.K., Hoffmann, K.H., and Volkl, W. (2004) Honeydew amino acids in relation to sugars and their role in the establishment of ant-attendance hierarchy in eight species of aphids feeding on tansy (*Tanacetum vulgare*). *Physiol. Entomol.* **29**: 311–319.
- Woodward, F.I. and Lomas, M.R. (2004) Vegetation dynamics - simulating responses to climatic change. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **79**: 643–70.
- Wuichet, K., Alexander, R., and Zhulin, I. (2007) Comparative genomic and protein sequence analyses of a complex system controlling bacterial chemotaxis. *Methods Enzymol.* **422**: 1–31.
- Wuichet, K. and Zhulin, I.B. (2003) Molecular evolution of sensory domains in cyanobacterial chemoreceptors. *Trends Microbiol.* **11**: 195–200.
- Xie, Z., Ulrich, L.E., Zhulin, I.B., and Alexandre, G. (2010) PAS domain containing chemoreceptor couples dynamic changes in metabolism with chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 2235–40.
- Xing, J., Bai, F., Berry, R., and Oster, G. (2006) Torque-speed relationship of the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 1260–5.
- Xu, Y., Luo, Q.-Q., and Zhou, M.-G. (2013) Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance in the phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *PLoS One* **8**: e55962.
- Yadav, R.K.P., Karamanoli, K., and Vokou, D. (2005) Bacterial colonization of the phyllosphere of mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. *Microb. Ecol.* **50**: 185–96.
- Yadeta, K.A. and Thomma, B.P.H.J. (2013) The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Front. Plant Sci.* **4**: 97.
- Yang, P., Vauterin, L., Vancanneyt, M., Swings, J., and Kersters, K. (1993) Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**: 47–71.

- Yang, T.-C., Leu, Y.-W., Chang-Chien, H.-C., and Hu, R.-M. (2009) Flagellar biogenesis of *Xanthomonas campestris* requires the alternative sigma factors RpoN2 and FliA and is temporally regulated by FlhA, FlhB, and FlgM. *J. Bacteriol.* **191**: 2266–75.
- Yao, J. and Allen, C. (2006) Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* **188**: 3697–3708.
- Yao, J. and Allen, C. (2007) The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *J. Bacteriol.* **189**: 6415–24.
- Yeats, T.H. and Rose, J.K.C. (2013) The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol.* **163**: 5–20.
- Yi, S.Y., Shirasu, K., Moon, J.S., Lee, S.-G., and Kwon, S.-Y. (2014) The activated SA and JA signaling pathways have an influence on flg22-triggered oxidative burst and callose deposition. *PLoS One* **9**: e88951.
- Young, G.M., Badger, J.L., and Miller, V.L. (2000) Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **68**: 4323–6.
- Young, J.M. (2008) An overview of bacterial nomenclature with special reference to plant pathogens. *Syst. Appl. Microbiol.* **31**: 405–24.
- Young, J.M., Dye, D., Bradbury, J.F., Panagopoulos, C.G., and Robbs, C.F. (1978) A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *J. Agric. Res.* **21**: 153–177.
- Young, J.M., Park, D.-C., Shearman, H.M., and Fargier, E. (2008) A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* **31**: 366–77.
- Yuan, J., Branch, R.W., Hosu, B.G., and Berg, H.C. (2012) Adaptation at the output of the chemotaxis signalling pathway. *Nature* **484**: 233–6.
- Zeng, W., Melotto, M., and He, S.Y. (2010) Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**: 599–603.
- Zhang, J., Lu, H., Li, X., Li, Y., Cui, H., Wen, C.-K., et al. (2010) Effector-triggered and pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity differentially contribute to basal resistance to *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **23**: 940–8.
- Zhang, W.-J., Santini, C.-L., Bernadac, A., Ruan, J., Zhang, S.-D., Kato, T., et al. (2012) Complex spatial organization and flagellin composition of flagellar propeller from marine magnetotactic ovoid strain MO-1. *J. Mol. Biol.* **416**: 558–70.
- Zhang, X., Davenport, K.W., Gu, W., Daligault, H.E., Munk, a C., Tashima, H., et al. (2012) Improving genome assemblies by sequencing PCR products with PacBio. *Biotechniques* **53**: 61–2.

- Zhang, Y., Callaway, E.M., Jones, J.B., and Wilson, M. (2009) Visualisation of *hrp* gene expression in *Xanthomonas euvesicatoria* in the tomato phyllosphere. *Eur. J. Plant Pathol.* **124**: 379–390.
- Zhao, S., White, D.G., Ge, B., Ayers, S., Friedman, S., English, L., et al. (2001) Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1558–64.
- Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C.L., Schaller, A., He, S.Y., and Howe, G.A. (2003) Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant J.* **36**: 485–499.
- Zheng, X.-Y., Spivey, N.W., Zeng, W., Liu, P.-P., Fu, Z.Q., Klessig, D.F., et al. (2012) Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe* **11**: 587–96.
- Zhou, Y.-F., Nan, B., Nan, J., Ma, Q., Panjikar, S., Liang, Y.-H., et al. (2008) C4-dicarboxylates sensing mechanism revealed by the crystal structures of DctB sensor domain. *J. Mol. Biol.* **383**: 49–61.
- Zhu, S., Kojima, S., and Homma, M. (2013) Structure, gene regulation and environmental response of flagella in *Vibrio*. *Front. Microbiol.* **4**: 1–9.
- Zhulin, I., Nikolskaya, A., and Galperin, M. (2003) Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in *Bacteria* and *Archaea*. *J. Bacteriol.* **185**: 285–294.
- Zhulin, I.B. (2000) A novel phototaxis receptor hidden in the cyanobacterial genome. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 491–493.
- Zhulin, I.B., Taylor, B., and Dixon, R. (1997) PAS domain S-boxes in *Archaea*, *Bacteria* and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 331–333.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T. (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* **428**: 764–7.
- Zrybko, C.L., Fukuda, E.K., and Rosen, R.T. (1997) Determination of glucosinolates in domestic and wild mustard by high-performance liquid chromatography with confirmation by electrospray mass spectrometry and photodiode-array detection. *J. Chromatogr. A* **767**: 43–52.
- Zukalová, H. and Vasak, J. (2002) The role and effects of glucosinolates of *Brassica* species. *Rostl. VÝROBA* **48**: 175–180.

Thèse de Doctorat

Arnaud INDIANA

Rôles du chimiotactisme et de la mobilité flagellaire dans la fitness des *Xanthomonas*

Roles of chemotaxis and flagellar motility in fitness of xanthomonads

Résumé

Les bactéries du genre *Xanthomonas* sont responsables de nombreuses maladies des plantes, telles que la nervation noire des Brassicacées causée par *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*). Lors des phases précoces du processus infectieux, ces bactéries doivent identifier des sites favorables à leur pénétration dans les tissus et les atteindre afin de s'internaliser dans les tissus végétaux et s'y multiplier. Le chimiotactisme est le mécanisme par lequel les bactéries détectent des signaux et se dirigent vers des attractants ou s'éloignent de signaux répulsifs. L'objectif de ce travail est de comprendre les rôles du chimiotactisme et de la mobilité flagellaire dans la fitness des *Xanthomonas*. Nous avons montré que la mobilité flagellaire n'est pas une caractéristique partagée par tous les *Xanthomonas* mais qu'environ 5% des souches perdent cette capacité sans altération majeure de leur fitness *in planta*. Un senseur du chimiotactisme, dénommé Hsb1, probablement acquis par transfert horizontal, présente un groupe d'allèles spécifique à *X. campestris*. Une mutation de *hsb1* dans la souche *Xcc* ATCC 33913 entraîne une diminution de l'internalisation de cette souche dans les tissus de plantes hôtes combinée à une augmentation de l'internalisation dans les tissus des plantes non-hôtes. Hsb1 perçoit un signal émis par les blessures des feuilles de chou. Un glucosinolate, la sinigrine, et un acide aminé, la L-phénylalanine, sont détectés *in vitro* par ce senseur, mais ne sont pas métabolisés. Des travaux complémentaires seront nécessaires pour identifier le signal détecté par ce senseur et envisager la conception de méthodes de lutte basées sur la confusion d'informations.

Mots clés

MCP, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Brassicaceae*, *Phaseolus vulgaris*, mobilité par nage.

Abstract

Xanthomonads are responsible for plant diseases such as black rot of *Brassicaceae* caused by *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*). During the early stages of the infection, pathogenic bacteria such as *Xcc* must detect favorable sites and ingress into host plant tissues to colonize and multiply in the apoplast or the xylem vessels. Chemotaxis is the mechanism used by bacteria to detect attractants and repellents and adapt in consequence its direction. The aim of this work is to understand the roles of chemotaxis and flagellar motility in the fitness of xanthomonads. We showed that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads. About 5 % of tested strains lost this ability without major impact on their fitness *in planta*. A chemotaxis sensor, named Hsb1, probably acquired by horizontal transfer shows a group of alleles that are specific of *X. campestris*. In *Xcc* ATCC 33913, a mutation in *hsb1* resulted in a decreased penetration of this strain in the host plant tissues combined with an increase penetration in the non-host plant tissues. Hsb1 sense a signal from wounds of cabbage leaves. *In vitro*, a glucosinolate, the sinigrin, and an amino acid, the L-phenylalanine are detected by Hsb1 but are not metabolized. Further work is needed to identify the signal detected by the sensor and to design control methods based on confusion.

Key Words

MCP, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Brassicaceae*, *Phaseolus vulgaris*, swimming motility.